

Thèse de Doctorat

Damien REVEILLON

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : VENAM

Discipline : Chimie analytique/Biologie des organismes

Spécialité : Toxines de microalgues

Unité de recherche : Laboratoire PHYC, Ifremer

BMAA et cyanotoxines : microalgues productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins

JURY

Rapporteurs : **Cécile BERNARD**, Professeur, MNHN
Thierry GUERIN, Directeur de recherches, ANSES

Examineurs : **Christine HERRENKNECHT**, Professeur, Université de Nantes
Emilie LANCE, Maître de conférences, Université de Reims
Yves-François POUCHUS, Professeur, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Zouher AMZIL**, Directeur de recherches, Ifremer

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Cécile Bernard et Thierry Guérin qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse ; ainsi que Christine Herrenknecht, Emilie Lance et Yves-François Pouchus, merci à tous d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un co-financement région Pays de la Loire – Ifremer et s'est déroulée au laboratoire phycotoxines (PHYC) de l'Ifremer de Nantes.

Un grand merci donc à Zouher Amzil, mon directeur de thèse et du laboratoire PHYC ainsi qu'à Véronique Séchet et Luc Brient, mes co-encadrants ; je vous suis reconnaissant de m'avoir fait confiance, « choisi », pour effectuer ce travail. Merci aux membres de mon comité de thèse : Christine Herrenknecht, Sabine Constant, Philipp Hess et Emmanuelle Roque D'Orbcastel. Merci à vous et à l'équipe encadrante d'avoir participé à ces moments importants, qui ont permis l'orientation et la réorientation de ce sujet de thèse et fait murir mes réflexions.

Un IMMENSE merci à toute l'équipe du labo PHYC :

Zouher, merci de m'avoir accueilli au sein de cette belle équipe et donné les moyens de faire ma thèse dans d'excellentes conditions. C'était une fierté pour moi de pouvoir intégrer un institut prestigieux comme l'Ifremer. Amandine, enfin une nouvelle biologiste dans cette équipe, merci pour les discussions enrichissantes et ta bonne humeur communicative. Véronique, au-delà de mon encadrement, merci pour ta gentillesse, ton recul, ton soutien et tes gâteaux au chocolat incroyables. Florence, merci de m'avoir encadré pour effectuer la manip' de contamination des moules et d'être venue à Pen Bé avec moi pour les récupérer (le pique-nique en plein vent le long de la côte restera un très bon souvenir). Virginie, je te remercie de m'avoir initié aux bioréacteurs, toujours disponible, aux petits soins pour les microalgues, merci d'avoir partagé tes connaissances sur le phytoplancton (et tes milieux de culture, ton eau de mer filtrée, tes souches de cryptophytes...) merci d'avoir diffusé ta motivation et ta bonne humeur. Michèle, la bienveillante. Merci pour ton écoute, ton soucis quotidien pour notre bien-être, notre moral, notre santé... Désolé de t'avoir embêté avec les cyanobactéries et merci de m'avoir formé à leur culture. Je ne sais pas dans quelle proportion elles me survivront mais tu n'auras plus besoin de faire des gélouses ! Merci à toi et à Virginie pour m'avoir suppléé pour leur repiquage, pour avoir effectué des cultures pour moi (et merci, sincèrement, d'avoir « célébré » le retrait de mes attelles). Mano, merci d'avoir accepté de co-encadrer Mathilde avec moi, c'était une super expérience, très enrichissante. Merci aussi d'avoir partagé tes connaissances en chimie analytique. Fabienne, merci pour ton soutien, ta compréhension, ton aide, j'espère que mes demandes sur Quadrigé² ne t'ont pas fait perdre trop de temps, ni mes galères sur le

système CL-SM/SM... Promis, je ne t'embêterai plus avec mes plans d'expérience ni mes questions sur le REPHY ! Georges, M. qualité, merci pour ta bonne humeur, tes anecdotes farfelues, nos discussions de biologie mais aussi de qualité. Encore félicitations pour l'accréditation, c'est une belle perf'. Nathalie désolée d'avoir généré autant de verrerie, merci pour ton travail quotidien essentiel aux activités du labo. Philipp, merci infiniment pour toutes les corrections effectuées sur mes articles et le temps que tu m'as accordé (mollusks matrices et ions ratios resteront gravés). Véronique, ma collègue « d'open space », merci de m'avoir formé à la spectrométrie de masse, j'avais ainsi toutes les clés pour répondre au challenge de l'analyse de la BMAA. Bon courage pour reprendre le flambeau... Un grand merci d'avoir largement contribué au développement des méthodes multi-cyanotoxines, c'était très enrichissant pour moi de travailler en tant que « chercheur » sur cette partie. Korian (et oui maintenant tu fais partie de l'équipe) merci pour ton humour et tes plaisanteries, bon courage pour les hivers rigoureux dans « mon » bureau ! Hélène, fraîchement arrivée, merci de ton aide et de ton implication.

Un remerciement spécial aux thésards de l'équipe, qui ont relevé le défi fou de faire une thèse avant, pendant, ou après moi (Thierry, Marie, Charline, Zita, Francesco et Nour, la relève). Merci pour vos conseils, votre compréhension, votre expérience. Merci plus particulièrement à Zita, avec qui on a fait face simultanément à chacune des étapes de nos thèses, c'était rassurant d'avoir quelqu'un à ses côtés qui sait exactement de quoi on parle !

Un grand merci à tous ceux qui ont, temporairement, gonflé les rangs de l'équipe et apporté beaucoup à notre quotidien : Mathilde, Nour, Aurélie, Hélène, Lucie, Claire, Diane, Thomas, Thomas et Jocelyn (merci pour les discussions « foot »), Emilie, Natacha, Antonia et sans doute d'autres... Merci à Mathilde, la première stagiaire que j'ai (co) encadré. Je garde un excellent souvenir de cette aventure, c'était très formateur, j'espère que c'est réciproque.

Merci aussi à ceux qui ont « quitté » l'équipe, Philippe Truquet et Patrick Lassus, c'était un immense plaisir de faire votre connaissance.

Merci à toute l'équipe, permanente ou temporaire. Merci pour les bons moments passés ensemble, les rires, les plaintes, votre humour, vos blagues, votre gentillesse, votre soutien, les pauses riches en gateaux et autres confiseries que tout Ifremer nous envie, mais aussi vos conseils et vos connaissances. C'était un plaisir de vivre avec vous ces 3 années et de partager votre quotidien.

Je voudrais aussi remercier les autres thésards d'Ifremer, et plus particulièrement Audrey, Judith et Stan sans qui cette « épreuve » n'aurait pas été la même. Que de bons moments en votre compagnie, vous m'avez beaucoup apporté.

Merci à la section badminton de l'Ifremer, les irréductibles et ceux de passage, Olivier (M. le président), Pierre, Alice, Laurence, Emilie, Patrick, Stephanie, Virginie, Thomas, Nour, Loic, Judith, les stagiaires d'EMH... Merci à vous, le jeudi midi était un moment très attendu, idéal pour décompresser. Les 2 sandwiches de la cantine (« sans mâche, c'est pour mon lapin ça ») vont me manquer...

Merci aux personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer, Eric Abadie (merci pour les inombrables sorties sur Thau, les identifications, les conseils, l'intérêt pour la BMAA), Estelle (merci pour tes picocyanobactéries et tes conseils), Emilie Lance (merci de m'avoir fait confiance pour effectuer les analyses de ta manip' de contamination de dreissènes), Bruno Bodiguel (merci de m'avoir fourni les moules pour ma manip' de contamination), William Camu (merci de m'avoir invité à ton séminaire pour partager mes résultats avec la communauté médicale).

Merci à ceux qui m'ont fait aimer la recherche : Aurélie Ledreux et Cécile Bernard ainsi que toute son équipe lors de mon premier stage au MNHN, l'équipe du professeur Luis Botana lors de mon second stage en Galice et enfin, Nicolas Creusot, Sélim Aït-Aïssa et l'équipe ECOT lors de mon stage de fin d'étude à INERIS. Merci à tous (particulièrement Nicolas), pour avoir participé à ma formation, partagé vos connaissances et m'avoir convaincu que la recherche était faite pour moi.

Merci à Evelyne Benoit, pour m'avoir reçu, écouté, guidé et facilité mes recherches de stages qui m'ont fait découvrir l'environnement et la communauté des toxines de microalgues, merci beaucoup.

Un remerciement particulier à toute ma famille et mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes études, mes choix et ma volonté de faire une thèse. Merci pour tout, je vous dois énormément et vous suis éternellement reconnaissant.

Merci à mes amis, qui ont à leur façon participé au bon déroulement de cette thèse, surtout à Julien, Gaëtan, Josselin et Sandra. Merci à tous pour les moments de décompression, votre sollicitude et vos tentatives de compréhension de mon sujet de thèse (non je ne travaille pas sur l'Alzheimer de la moule).

Enfin, Mélissa. Ma vie est plus belle depuis que tu m'as rejoint à Nantes et tout est plus simple. Je sais que je ne le dis pas assez souvent mais merci d'être là, de prendre soin de moi, de m'apporter réconfort, tendresse et amour. Tu as énormément contribué à ma réussite, merci pour tout, infiniment.

Et merci à tous les autres...

Table des matières

Liste des figures	I
Liste des tableaux/tables.....	VIII
Liste des annexes.....	XII
Liste des abréviations	XIII
Contexte, origines et objectifs de l'étude	1
Chapitre 1 : Etat de l'art	11
1. Microalgues nuisibles d'eaux douces et marines.....	13
1.1. Généralités	13
1.2. Prolifération des microalgues nuisibles.....	15
2. β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) et isomères	18
2.1. Organismes producteurs	18
2.1.1. Cycadaceae et autres plantes.....	18
2.1.2. Cyanobactéries	19
2.1.3. Autres microalgues.....	21
2.2. Voie de biosynthèse	22
2.3. Facteurs favorisant la production de BMAA par les microalgues	24
2.4. Rôle de la BMAA	25
2.5. Toxicité	26
2.5.1. <i>In vivo</i>	26
2.5.2. <i>In vitro</i>	29
2.6. Lien BMAA/SLA.....	34
2.6.1. Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)	34
2.6.2. Historique du lien BMAA-SLA	36
2.7. Incorporation de la BMAA dans les protéines ?	39
2.8. Analyse de la BMAA et ses isomères.....	41
2.8.1. Méthodes physico-chimiques.....	41
2.8.2. Controverse analytique et conséquences	48
2.9. Accumulation de la BMAA et ses isomères	51
2.9.1. Présence dans l'environnement et les microalgues.....	51

2.9.2. Présence dans les organismes aquatiques	52
2.9.3. Interactions toxines et mollusques bivalves filtreurs.....	55
2.10. Bioaccumulation/biomagnification de la BMAA ?.....	57
3. Risques et réglementations liés à la BMAA.....	59
Chapitre 2 : Développement d'une méthode HILIC-SM/SM pour l'analyse de la BMAA et ses isomères.....	63
1. Contexte	65
2. Approche méthodologique et objectifs	65
3. Beta-N-Methylamino-L-Alanine: LC-MS/MS Optimization, Screening of Cyanobacterial Strains and Occurrence in Shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon	67
3.1. Résumé	67
3.2. Abstract	68
3.3. Introduction.....	68
3.4. Results and discussion.....	70
3.4.1. Optimization of the Analysis of BMAA and Isomers	70
3.4.2. Cell Lysis and Solvent Extraction	71
3.4.3. Comparison of Solid Phase Extraction (SPE) Sorbents	72
3.4.4. Optimization of Selectivity: Chromatographic Resolution and Mass Spectral Transitions.....	74
3.4.5. Characterization of the Analytical Procedure	76
3.4.6. Screening of BMAA and Isomers in Cyanobacteria	80
3.4.7. Screening of Mollusks of Thau Lagoon.....	83
3.5. Experimental Section.....	88
3.5.1. Chemicals and Reagents.....	88
3.5.2. Samples.....	88
3.5.3. Sample Preparation	89
3.5.4. Analysis by LC-MS/MS	90
3.5.5. Recoveries and Matrix Effects	91
3.5.6. Statistical Analysis	92
3.6. Conclusions.....	92
Bibliography.....	94
Chapitre 3 : Evaluation de la présence de la BMAA et ses isomères dans l'environnement	101
1. Contexte	103

2. Objectifs et approche méthodologique	103
3. β - <i>N</i> -methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: distribution in different food web compartments of Thau Lagoon, French Mediterranean Sea	106
3.1. Résumé	106
3.2. Abstract	106
3.3. Introduction.....	107
3.4. Material and Methods.....	109
3.4.1. Chemicals and reagents.....	109
3.4.2. Samples.....	109
3.4.3. Sample preparation	112
3.4.4. HILIC-MS/MS analysis	112
3.4.5. Statistical Analysis	113
3.5. Results and Discussion.....	113
3.5.1. Sample preparation and analysis	113
3.5.2. Temporal and spatial distribution of BMAA and isomers in environmental samples.....	114
3.5.3. Phytoplankton community and culture of organisms as possible sources of BMAA in Thau lagoon	119
3.5.4. Hypothesized bioaccumulation pathway in different compartments of the Thau lagoon ecosystem.....	123
3.6. Conclusions and perspectives	126
3.7. Supplementary material	127
4. Contexte	129
5. Objectifs et approche méthodologique	129
6. Systematic detection of BMAA (β - <i>N</i> -methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in shellfish production areas along the French coasts.....	131
6.1. Résumé	131
6.2. Abstract	132
6.3. Introduction.....	132
6.4. Material and Methods.....	134
6.4.1. Chemicals and reagents.....	134
6.4.2. Samples.....	135
6.4.3. Sample extraction.....	137

6.4.4. Instrumentation and analytical method.....	138
6.5. Results	138
6.5.1. HILIC-MS/MS performance.....	138
6.5.2. BMAA and isomers in mollusks collected within the vigilance surveillance program	139
6.5.3. Phytoplankton populations database of REPHY.....	141
6.5.4. BMAA and isomers in lab-cultured microalgae	143
6.6. Discussion	145
6.7. Conclusion	149
6.8. Supplementary material	151
Chapitre 4 : Contamination de moules bleues avec une diatomée produisant de la BMAA.....	155
1. Contexte	157
2. Objectifs et approche méthodologique	157
3. BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid): production kinetics by four diatom species and contamination experiment of <i>Mytilus edulis</i>	159
3.1. Résumé	159
3.2. Abstract	160
3.3. Introduction.....	160
3.4. Material and Methods.....	162
3.4.1. Chemicals and reagents.....	162
3.4.2. Culture conditions of diatoms for the BMAA and DAB kinetic studies	162
3.4.3. Antibiotic treatments of <i>P. tricornutum</i> culture	163
3.4.4. Isolation of bacterial colonies.....	163
3.4.5. Experimental contamination of blue mussels.....	164
3.4.6. Extraction procedures for total form of BMAA and DAB	166
3.4.7. Instrumentation and analytical method for BMAA and DAB	166
3.4.8. Statistical analysis.....	167
3.5. Results	167
3.5.1. Kinetics of BMAA production by four diatoms species	167
3.5.2. BMAA in <i>P. tricornutum</i> treated with antibiotics.....	170
3.5.3. BMAA and isomers in bacteria isolated from <i>P. tricornutum</i> and mussels.....	170
3.5.4. Contamination of mussels with <i>P. tricornutum</i>	170

3.6. Discussion	172
3.7. Conclusion	177
3.8. Supplementary material	178
Conclusions et perspectives	183
Valorisation scientifique	195
Références	197
Annexes	229

Liste des figures

- Figure 1 : distribution phylogénétique des phototrophes terrestres et aquatiques basée sur les caractéristiques morphologiques. La grande diversité des phototrophes aquatiques contraste avec celle des plantes terrestres, largement dominées par un seul clade (*i.e.* Embryophytes). Dessiné par C. de Vargas et repris de Falkowski et al. (2004)..... 13
- Figure 2 : facteurs (positifs et négatifs) qui influencent la formation de blooms de cyanobactéries toxiques dans les écosystèmes aquatiques (Paerl and Otten, 2013)..... 16
- Figure 3 : structure de la BMAA et trois de ses isomères naturels, le DAB l'AEG et la BAMA (Jiang et al., 2012)..... 18
- Figure 4 : photographies de (a) un *Cycas micronesica*, (b) des racines coralloïdes de cet arbre, le cadre rouge montrant la présence de cyanobactéries dans la coupe réalisée, (c) une section des racines dévoilant un anneau vert correspondant à la cyanobactérie endosymbiotique, (d) une chauve-souris se nourrissant des graines et (e) d'une culture de *Nostoc* sp. isolée à partir des racines. Repris de Cox et al. (2003)..... 20
- Figure 5 : voie de biosynthèse prédite de la BMAA par Brenner et al. 2003. Repris de Araoz et al. (2010). AD-S⁺ : S-adenosyl-L-méthionine..... 23
- Figure 6 : schéma illustrant quelques mécanismes toxiques rapportés pour la BMAA, *in vitro*. Inspiré de Chiu et al., 2011. La plupart des mécanismes toxiques engendrés nécessitent la présence d'ions HCO₃⁻ et donc la formation d'un adduit carbamate. Sous cette forme, la BMAA peut se lier aux différents récepteurs du glutamate, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ ce qui perturbe l'homéostasie cellulaire (excitotoxicité (1)). Rao et al. (2006) ont ensuite rapporté la présence de ROS dans les neurones moteurs (2) sans doute un effet secondaire de l'entrée d'ions Ca²⁺ via les récepteurs AMPA/kainate. La BMAA inhibe l'antiport cystine-glutamate X_c⁻ ce qui a deux effets : le relargage de glutamate dans le milieu extracellulaire qui va à son tour se lier aux récepteurs et potentialiser l'excitotoxicité (3) puis l'inhibition de la formation de glutathion qui génère indirectement des ROS (4). L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ ainsi que les ROS perturbent l'activité mitochondriale (5) ce qui va induire davantage de ROS et l'apoptose (6). Chiu et al. 2012 observent également la formation de ROS par la BMAA seule (*i.e.* sans adduit carbamate) par un mécanisme inconnu (7). Les mécanismes de toxicité sur les cellules gliales semblent être similaires. Cependant, la BMAA induirait de plus un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M ce qui engendre l'apoptose des

cellules. La gliotoxicité globale augmenterait la susceptibilité des neurones aux excitotoxines comme la BMAA (9). Finalement, l'incorporation de la BMAA dans les protéines pourrait perturber l'homéostasie protéique (10) et participer au développement et à la progression lente des maladies neurodégénératives.	33
Figure 7 : biomagnification de la BMAA dans l'écosystème de Guam, sous forme libre et liée, et schéma du réservoir neurotoxique endogène (e.g. comme supposé dans le cerveau des Chamorro). Modifié à partir de Murch et al. (2004a).....	37
Figure 8 : schéma globale de l'analyse de la BMAA et ses isomères. TCA : acide trichloroacétique ; FMOC : 9-fluorenylmethylchloroformate.	42
Figure 9 : principe et étapes de la SPE. Les croix jaunes représentent les molécules d'intérêt.	43
Figure 10 : diagramme simplifié du processus alimentaire chez l'huître creuse et plus généralement pour les mollusques bivalves. Repris de Lassus et al. (2003).	55
Figure 11 : schémas hypothétiques de transfert de la BMAA dans une chaîne alimentaire de (A) la mer Baltique et (B) le lac Taihu en Chine. Repris de Jonasson et al. (2010) et Jiao et al. (2014), respectivement.	58
Figure 12 : approche méthodologie pour la mise en place d'une méthode HILIC-SM/SM pour l'identification non ambiguë et la quantification précise de la BMAA et ses isomères, sous forme libre et associée aux protéines, dans les matrices de cyanobactéries, huîtres et moules.	66
Figure 13 : extraction recoveries of BMAA and D ₅ DAB spiked at 30 ng/mL in (A) cyanobacteria and (B) mussel matrix with five different solvents (n = 3, error bars represent standard deviations). Results are expressed relatively to the recoveries in trichloroacetic acid (TCA) 0.1 M. * p < 0.01 and ** p < 0.001 compared to TCA 0.1 M. FA, formic acid; AA, acetic acid.	72
Figure 14 : recoveries of pure standards spiked at 30 ng/mL in different extraction solvents (n = 3, error bars represent standard deviations). Replicates with the same letter are not significantly different, while replicates with different letters are significantly different (p < 0.05).	72
Figure 15 : recoveries of mixed solutions of standards spiked in TCA 0.1 M at a final concentration of 30 ng/mL. Comparison between 60 mg/3cc Plexa PCX and Oasis® MCX cartridges (n = 3, error bars represent standard deviations). * p < 0.05 compared to recoveries with Plexa PCX. # p < 0.005 compared to D ₅ DAB and DAB with Oasis® MCX.....	73
Figure 16 : chromatographic resolution between BMAA/DAB, optimized using a 23 factorial design. Since temperature did not influence the resolution significantly, it was set to 30 °C. A resolution of 1.5 corresponds approximately to the baseline resolution. ACN, acetonitrile.....	74

Figure 17: chromatograms of BMAA, D ₅ DAB and AEG spiked at 50 ng/mL into (A) standards, (B) cyanobacteria, (C) oyster and (D) mussel matrices after extraction of free analytes. Colored lines represent mass spectral transitions at m/z 119 to m/z 102 (blue), 88 (red), 76 (green), 101 (purple), 74 (grey) and m/z 124 to m/z 47 (dark).	75
Figure 18 : the effect of the SPE clean-up on mussel matrix spiked with BMAA and AEG after extraction of free amino acids (DAB naturally present in the sample). The black line corresponds to the mass spectral transition m/z 119 > 102. (A) Spiked mussel extracted with TCA 0.1 M and injected in this solvent, while (B) the same sample subjected to PCX SPE clean-up and injected in ACN/water/FA. The shift in retention times compared to other chromatograms is due to the non-use of the guard column in (B) and due to the injection solvent, matrix effects and the non-use of a guard column in (A).	78
Figure 19 : growth curves (red line, cross symbols) and free (dark histograms) and bound (grey histograms) DAB concentration for (A) <i>Nostoc</i> CCMP 2511 and (B) <i>Leptolyngbya</i> PCC 73110.	81
Figure 20 : (A–C) BMAA, DAB and AEG concentrations in free (black circles) and total form (empty circles) in mussels collected in 2009 and (D–F) in oysters. Mollusks were sampled in two of the three areas where shellfish were cultured in the lagoon and analyzed for both areas when material was available.	85
Figure 21 : chromatograms of spiked (dark line) and non-spiked, naturally-contaminated (A) oyster and (B) mussel samples after performing the extraction for the determination of total BMAA and isomers. Colored lines represent mass spectral transitions m/z 119 to m/z 102 (blue, top graphs), 88 (red) and 101 (purple) in the middle graphs and 76 (green) and 74 (grey) in the bottom graphs.	87
Figure 22 : Carte de l'étang de Thau. Les principales zones conchylicoles sont représentées par les zones quadrillées. Repris de Pernet et al. (2012).	104
Figure 23 : représentation simplifiée d'un réseau trophique aquatique (Humbert et al., 2001). En rouge, les interactions que nous avons étudiées.	105
Figure 24: map of Thau lagoon showing the sampling location (104-P-037).	110
Figure 25: extracted ion chromatograms of periphyton of March 2014	114
Figure 26: relative abundance (mean $\pm$ SD) of free and bound BMAA and isomers between digestive gland (DG) and remaining flesh (RF) tissues of all mussel samples collected during the sampling period. Free AEG concentrations were rarely detected so only relative abundance of bound AEG are represented. * $P < 0.05$ in comparison to the relative abundance in the remaining flesh tissue (t-test).	116

Figure 27: concentrations of total DAB (empty squares), BMAA (black circles) and AEG (grey triangles) found in periphyton samples.	118
Figure 28: concentrations of total BMAA and DAB in seston collected with phytoplankton nets of 20 and 63 μm , depending on the date of sampling. Note: * only biomass collected with a 63 μm mesh size net was sampled on December 2, 2013 while Nd: BMAA and DAB were not detected in the seston collected with a 20 μm screen on October 15 and November 4, 2013.	119
Figure 29: extracted ion chromatograms of (A) <i>Chaetoceros calcitrans</i> CCMP 1315, (B) <i>Chaetoceros</i> sp. from Argenton, (C) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1055/1 and (D) <i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1015.	122
Figure 30: total BMAA and DAB ($\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight, expressed as the mean of concentrations in digestive glands and remaining flesh) in mussels collected in Thau lagoon, and diatom abundance (cells.L^{-1}) determined by the REPHY during the same period at the same sampling point. The pie charts on the top of the graph represent proportions of major species of diatoms as a function of the season (sum over three month periods).	124
Figure 31: hypothesized bioaccumulation pathway within the Thau lagoon ecosystem. Mean concentrations of total BMAA and DAB are expressed as $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight. The plain arrows represent the hypothesized trophic links while dotted arrows represent non-confirmed links.	126
Figure 32 : free (empty symbols) and total (dark symbols) concentration in $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW for both digestive glands (DG, circle) and remaining flesh (RF, square) of (A) DAB and (B) BMAA in mussels collected in Thau lagoon between July 2013 and October 2014.	128
Figure 33 : description du fonctionnement du REPHY et son intérêt dans le cadre de notre étude.	130
Figure 34: Map of French coastline with the ten sentinel sites selected for the vigilance surveillance program.	135
Figure 35: Abundances of diatoms, dinoflagellates and other classes of phytoplankton reported by REPHY in 2013 and BMAA and DAB concentrations obtained in the digestive glands of mussels sampled at (A) Pointe de St Quentin, (B) Antifer ponton pêche, (C) Agon, (D) Le Scoré, (E) Kervoyal, (F) Banc Arguin sud and (G) Etang de Diana, within the vigilance surveillance program. Only partial counting was available for Agon phytoplankton populations.	140
Figure 36: Abundances of diatoms and dinoflagellates reported by REPHY in 2013 and BMAA and DAB concentrations obtained in the digestive glands of oysters sampled at (A) Ronce and (B) Parc Leucate, within the vigilance surveillance program.	141
Figure 37: Extracted ion chromatograms of BMAA, DAB and AEG of digestive gland tissues of (A) oyster from “Ronce” and (B) mussel from “Kervoyal”. For the oyster sample, there is a co-elution	

between BMAA and an interfering compound leading to false ion ratios. However, the two peaks are partially resolved for mussel sample and the ion ratios are in agreement with those of the standards.....	151
Figure 38 : approche méthodologique pour tenter de contaminer des moules avec <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , une diatomée contenant de la BMAA.....	158
Figure 39: growth (grey circle symbols) and production of BMAA (white bars) and DAB (black hatched bars), for respectively (A, B) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCAP 1055/1, (C, D) <i>Chaetoceros</i> sp. (E, F) <i>Chaetoceros calcitrans</i> CCMP 1315 and (G, H) <i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1015. Error bars correspond to standard deviation. Cellular concentration was used as a proxy of growth only for <i>P. tricornutum</i> while fluorescence of chlorophyll was used as an alternative for the three other strains (<i>i.e.</i> formation of aggregates led to underestimated concentrations of cells).	168
Figure 40 : mean concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) $\pm$ SD in digestive gland (DG) and remaining flesh tissues (RF) of (A, B) BMAA (white bars), (C, D) DAB (black hatched bars) and (E, F) AEG (grey bars). Treatment 1: unfed; 2: Fed <i>T. lutea</i> ; 3: Fed <i>P. tricornutum</i> (5 days); 4: Fed <i>P. tricornutum</i> (5 days + 2 extra days); * significantly different from the control group ($p < 0.05$).	171
Figure 41 : extracted ion chromatograms of <i>P. tricornutum</i> culture at day 25 of the kinetic experiment. Black dotted line represent transition m/z 122 > 105 used to quantify D ₃ BMAA. It can be seen that retention time of the internal standard matched the one of BMAA naturally occurring in the culture of <i>P. tricornutum</i> . Moreover, no compound interfered with the transition m/z 119 > 102.	178
Figure 42 : extracted ion chromatograms of (A) digestive gland of mussel at J0 and (B) digestive gland of mussels fed <i>P. tricornutum</i> for 5 days that stayed two more days in clear water. Black dotted line represent transition m/z 122 > 105 used to quantify D ₃ BMAA while dark grey and light grey lines represent transition m/z 119 > 88 and 119 > 76, respectively. As a compound interfered with the transition m/z 119 > 102, only specific mass spectral transitions showing no interference were represented It can be seen that retention time of the internal standard matched the one of BMAA naturally occurring in mussel digestive gland and in mussel fed a diatom containing BMAA.....	179
Figure 43 : schéma des effets nocifs possibles des blooms de cyanobactéries. Adapté de Havens (2008).	231
Figure 44 : structure générale de (A) la microcystine et (B) la nodularine	233
Figure 45 : structure de la (A) cylindrospermopsine et son analogue non toxique (B) la désoxycylindrospermopsine.....	235

Figure 46 : structure de l'anatoxine-a (ATX) et ses analogues. Adapté de Hiller et al. (2007).....	236
Figure 47 : structure de l'anatoxine-a(s)	238
Figure 48 : structure générale de la saxitoxine et ses analogues.....	238
Figure 49 : structure de (A) la lyngbaytoxine A et (B) l'aplysiatoxine.	240
Figure 50 : l'oxydation de l'acide aminé atypique Adda (ici à partir de la MC-LR) entraîne la formation de l'acide carboxylique MMPB (Neffing et al., 2010).....	244
Figure 51 : principales méthodes et configuration pour l'analyse des cyanotoxines en utilisant la spectrométrie de masse.....	246
Figure 52 : différentes méthodes d'analyse des cyanotoxines	250
Figure 53 : concentrations de MCs (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW) dans (A) les invertébrés aquatiques et (B) les poissons en fonction de leur régime alimentaire. Les boîtes à moustaches représentent la médiane, les écart-types, les 5 ^{ème} et 95 ^{ème} centiles des valeurs maximales retrouvées dans chaque étude, indépendamment des organes/tissus considérés. Les cercles noirs représentent les valeurs minimales et maximales rapportées. Le nombre d'échantillons, n, correspond aux nombres de données pour chaque taxon. En tout, 55 études ont été considérées pour les invertébrés aquatiques et 28 pour les poissons. Elles correspondent à des échantillons environnementaux ou à des expositions en conditions contrôlées (à des cultures de cellules vivantes ou lyophilisées de cyanobactéries ou à leurs toxines dissoutes). Repris de Ferrao and Kozlowsky-Suzuki (2011)...	262
Figure 54 : différentes voies d'expositions aux cyanotoxines pour l'homme. Repris de Merel et al. (2013b).	264
Figure 55 : approche méthodologique pour l'optimisation de la procédure d'analyse mutli-cyanotoxines par CL-SM/SM et l'analyse d'échantillons environnementaux.	272
Figure 56: chemical structure and molecular weight of some studied cyanotoxins.....	277
Figure 57: map of French coastline with the sites of sampling for mollusk and periphyton samples.....	279
Figure 58: extracted ion chromatograms (<i>i.e.</i> only quantitative transitions were used) of standard solutions of (A) lipophilic and (B) hydrophilic cyanotoxins separated by RPLC and HILIC column, respectively.	284
Figure 59: extracted ion chromatograms of (A) DoCYN and (B) CYN detected in the periphyton sample collected on May 5, 2014 from mussels of Thau lagoon. Identity was confirmed by correct retention time, product ions and ion ratios.....	289
Figure 60: relative extraction recoveries obtained with 2 mL tube and 250 mg (white bars) or 500 mg (light grey bars) glass beads or 1.5 mL tube and 250 mg (dark grey bars) or 500 mg (black bars)	

glass beads. Results were expressed relatively to peak areas obtained with the selected conditions, <i>i.e.</i> 500 mg of beads and the 1.5 mL tube.	291
Figure 61: recoveries for (A) <i>Nostoc</i> sp. CCMP 2511, (B) oyster and (C) mussel matrices spiked before extraction with the three different methanol – 0.1 M acetic acid mixtures (MeOH 25%/0.1M AcOH (white bars), MeOH 50%/0.1 M AcOH (grey bars) and MeOH 75%/0.1 M AcOH (black bars)). Results are expressed relatively to recovery obtained with the selected extraction solvent (<i>i.e.</i> MeOH 75%/0.1 M AcOH). The high differences of recoveries for CYN and ATX in <i>Nostoc</i> sp. are exacerbated by the fact the low recoveries were obtained.	292
Figure 62 : structure chimique, pKa et log K_{ow} pour la BMAA et deux de ses isomères. Repris de Roy-Lachapelle et al., 2015.	302
Figure 63 : mécanismes de rétention des analytes sur l'adsorbant Oasis® MCX mixte phase polymérique-échange de cations.	302

Liste des tableaux/tables

Tableau 1 : quelques caractéristiques morphologiques et cytologiques pour les cyanobactéries, dinoflagellés et diatomées. Adapté de Abdennadher (2014).	14
Tableau 2 : exemples de microalgues toxiques, type de toxine et environnement dans lequel elles sont retrouvées	17
Tableau 3 : Espèces de microalgues (procaryotes et eucaryotes) confirmées comme productrices de BMAA et isomères.	22
Tableau 4 : exemples d'études toxicologiques <i>in vivo</i> . La voie d'exposition, l'organisme, la concentration et la durée d'exposition ainsi que les effets observés sont rapportés. Basé sur Karamyan et Speth (2008) et Chiu et al. (2011) et complété avec les données récentes.	27
Tableau 5 : exemples d'études toxicologiques <i>in vitro</i> . Le modèle cellulaire, les concentrations et la durée d'exposition ainsi que les effets observés sont rapportés. Basé sur Chiu et al. (2011) et complété avec les données récentes.	30
Tableau 6 : rendements SPE et effets matrices restant pour l'analyse de la BMAA à partir de différentes matrices.	44
Tableau 7 : principaux agents de dérivation utilisés dans l'analyse de la BMAA, ions moléculaires et fragments obtenus pour l'analyse par spectrométrie de masse. Les ions obtenus sans dérivation ont aussi été rapportés, pour comparaison.	45
Tableau 8 : sélectivité, performances, avantages et inconvénients des trois principales méthodes d'analyse de la BMAA.	49
Tableau 9 : concentrations de BMAA et isomères libres dissous dans des prélèvements d'eau (concentrés par SPE) et de BMAA et isomères sous forme totale (ou liée) dans des prélèvements d'eau ou des blooms de cyanobactéries.	52
Tableau 10 : différentes concentrations de BMAA rapportées par des techniques sélectives dans différents organismes.	54
Table 11 : 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 3.5.5.	76
Table 12 : retention times, correlation coefficients (r^2) and ion ratios of standards' curves and spiked cyanobacteria (<i>Leptolyngbya</i> PCC73110), oyster and mussel matrices (mean $\pm$ SD) for the extraction of free and total amino acids. For standards, the results came from 33 injections of	

the five-point calibration curves. For matrices, results originate from the established three-point standards' curves (3–50 ng/mL) for matrix effects injected twice (for r^2 , $n = 2$) and both matrix effects and SPE recoveries for RT and ion ratios ($n = 6$).....	80
Table 13 : the content of free and total DAB ($\mu\text{g/g DW}$) in ten strains of cyanobacteria. When more than one discrete sample was screened (different medium of culture or days of growth), the minimum and the maximum concentrations are reported.....	83
Table 14 : parameters used for optimal detection of BMAA and isomers with the 5500 QTRAP mass spectrometer.....	91
Table 15: origin and culture conditions of microalgal strains screened for total BMAA, DAB and AEG. Culture media were prepared accordingly to Walne (1970) for Conway medium, Provasoli (1968) for ESP medium, Guillard and Hargraves (1993) for L1 medium, Keller et al. (1987) for K medium and Harrison et al. (1980) for ESAW medium. Here, the ESAW medium was modified by adding ammonium chloride (final concentration of 563 μM).	111
Table 16: concentrations of total BMAA, DAB and AEG in the 15 lab-cultured microalgae.....	121
Table 17 : composition of the plankton community in seston collected with phytoplankton nets. Major species of diatoms, dinoflagellates and zooplankton were mentioned in brackets. Overall abundance was evaluated between low concentration (+) and bloom (+++++) as an indication of the density of plankton organisms.....	128
Table 18: Origin and conditions of culture of the microalgae species that were screened for total BMAA, DAB and AEG. The culture media were prepared accordingly to Guillard (1975) for f/2 medium, Guillard and Hargraves (1993) for L1 medium, Walne (1970) for Conway medium, Tompkins et al. (1995) for PE medium and Provasoli (1968) for ESP medium. For L1 modified medium, 190 μM of NaHCO_3 were added.....	137
Table 19: Phytoplankton data (2013) of REPHY corresponding to the closest sentinel sites of the vigilance surveillance program. The number of identified taxa/groups, the proportion (qualitative and quantitative) of major classes, the total abundance and the most abundant species were reported. Only partial phytoplankton counting was available for Agon (adjacent to Antifer) thus the results were not included.	142
Table 20: Concentrations of total form of BMAA, DAB and AEG in the lab-cultured microalgae. The presence of similar species observed within the framework of REPHY is mentioned as well as the number of sites in which the species were counted.....	144
Table 21: BMAA levels in bivalve mollusks used in this study and in previous articles	146
Table 22: experimental conditions to which mussels were exposed.....	165

Tableau 23 : gènes de biosynthèse des cyanotoxines ainsi que le numéro d'accèsion dans Genbank (Dittmann et al., 2013).	242
Tableau 24 : résumé des caractéristiques de certaines méthodes d'analyses multi-toxines CL-SM ou CL-SM/SM.....	249
Tableau 25 : exemples de concentrations de cyanotoxines observées dans le monde (forme dissoute, particulaire).	253
Tableau 26 : exemples de concentrations de cyanotoxines rapportées dans les crustacés. Lorsque plusieurs organes ont été analysés, les concentrations (maximales quand disponibles ou moyennes) ont été rapportées pour chaque organe. Lorsque plusieurs espèces ont été analysées dans la même étude, seules les concentrations maximales ont été rapportées.....	255
Tableau 27 : exemples de concentrations de cyanotoxines rapportées dans les mollusques bivalves et les gastéropodes. Lorsque plusieurs organes ont été analysés, les concentrations (maximales quand disponibles ou moyennes) ont été rapportées pour chaque organe. Lorsque plusieurs espèces ont été analysées dans la même étude, seules les concentrations maximales ont été rapportées.	256
Tableau 28 : exemples de concentrations de cyanotoxines rapportées dans les poissons. Lorsque plusieurs organes ont été analysés, les concentrations (maximales quand disponibles ou moyennes) ont été rapportées pour chaque organe. Lorsque plusieurs espèces ont été analysées dans la même étude, seules les concentrations maximales ont été rapportées.....	257
Tableau 29 : Résumé de quelques expériences en laboratoire avec des mollusques exposés à des microalgues toxiques.....	260
Tableau 30 : réglementation et valeurs de recommandation ou d'alerte relatives aux cyanotoxines dans les eaux de boissons et récréatives (<i>i.e.</i> valeurs entre parenthèses). Repris de Chorus (2012)..	265
Tableau 31 : exemples de valeurs de recommandation ou d'alerte pour la gestion des cyanotoxines dans les organismes aquatiques consommés. Modifié à partir de Ibelings et al. (2014).....	266
Tableau 32 : tolérances à la salinité rapportées pour certains genres de cyanobactéries. Tableau modifié à partir de Paerl et al. (2001).....	269
Table 33: optimized LC-MS/MS conditions and retention times for the lipophilic cyanotoxins.	281
Table 34: optimized LC-MS/MS conditions and retention times for the hydrophilic cyanotoxins.	282
Table 35: limit of quantification ($S/N \geq 10$) for each toxin, on column (pg, injection volume 5 μL) and in the matrix ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	285

Table 36: total recoveries and matrix effects (% , $\pm$ SD) of studied cyanotoxins obtained by spiking the three matrices in triplicate, either before or after extraction. For matrix effects, results $\leq$ 100% corresponded to signal suppression while $\geq$ 100% to signal enhancement.	286
Table 37: matrix effects on retention times for CYN, ATX, HATX and STX, expressed as a shift (min) between the standards spiked in the matrices and the pure standards (mean $\pm$ SD).....	292
Tableau 38 : intoxications humaines liées aux cyanobactéries et/ou à leurs toxines.	300

Liste des annexes

Annexe 1 : Analyse bibliographique des cyanotoxines	231
Annexe 2 : Chapitre 5 : Développement de deux méthodes CL-SM/SM multi-cyanotoxines et évaluation de leur présence sur le littoral français métropolitain.....	268
Annexe 3 : sites et substitutions pour différents analogues de la microcystine et de la nodularine. Adapté de Hiller et al. (2007).	293
Annexe 4 : structure de la saxitoxine et certains de ses analogues produits par différents genres de cyanobactéries . Elles sont également produites par plusieurs dinoflagellés marins sauf les LWTX, produites spécifiquement par <i>Lyngbya wollei</i> . Adapté de Wiese et al., 2010.....	294
Annexe 5 : schéma de biotransformation des PSTs. Les groupes indiqués en rouge correspondent à la modification apportée par rapport au composé de base, la STX. Les lignes pleines correspondent à des bioconversions connues alors que les lignes en pointillées sont des conversions supposées (Wiese et al., 2010).	295
Annexe 6 : structure de certains lipopeptides neurotoxiques, comme rapporté par (Araoz et al., 2010)	296
Annexe 7 : caractéristiques des principales classes de cyanotoxines basé sur (van Apeldoorn et al., 2007; Araoz et al., 2010; Metcalf and Codd, 2012; Moreira et al., 2013).....	297
Annexe 8 : utilisation de la SPE pour l'extraction/purification des échantillons contenant des cyanotoxines.....	298
Annexe 9 : cas d'intoxications aux cyanotoxines rapportés ou suspectés pour l'Homme (Ibelings et al., 2014).....	300
Annexe 10 : principe de la procédure de purification de BMAA par les cartouches SPE mixte phase polymérique-échanges cationiques, type Oasis® MCX.	302
Annexe 11 : schémas de derivation publiés pour la BMAA réagissant avec différents agents de dérivation. (A) le dérivé FMOC, (B) le dérivé propylchloroformate et (C) le dérivé AQC.....	303
Annexe 12 : tableau résumant les principales méthodes analytiques développées pour l'analyse de la BMAA et ses isomères.....	304
Annexe 13 : ensemble des souches de microalgues (procaryotes et eucaryotes) criblées lors de ces travaux de thèse pour rechercher la BMAA et ses isomères sous forme libre (parfois) et totale (systématiquement). Lorsque plusieurs échantillons étaient disponibles [différentes conditions de culture (e.g. nombre de jours, milieu)] les concentrations minimales et maximales obtenues ont été rapportées.	305

Liste des abréviations

ACN (ou MeCN) : Acétonitrile	LOQ : <i>Limit of quantification</i> (limite de quantification)
Adda : acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-méthoxy-2-6-8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque	LPS : Lipopolysaccharides
AEG : <i>N</i> -(2-aminoéthyl)glycine	LWTXs : Lyngbyatoxines de <i>Lyngbya wollei</i>
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate	MeOH : Méthanol
AQC : 6-aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl carbamate	MCs : Microcystine(s)
ARN (ARNm, ARNt) : Acide ribonucléique (messager, de transfert)	MMPB : acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phényl-butyrique
ATXs : Anatoxine-a (et analogues)	MRM (ou SRM) : <i>Multiple reaction monitoring</i> (<i>Selective reaction monitoring</i>)
BAMA : β -amino- <i>N</i> -méthylalanine	<i>m/z</i> : rapport masse sur charge
BMAA : β - <i>N</i> -méthylamino-L-alanine	NH ₄ OH : Hydroxyde d'ammonium
CCMP : <i>Culture collection of marine phytoplankton</i>	NMDA : <i>N</i> -méthyl-D-aptate
CL-SM(/SM) : Chromatographie liquide – spectrométrie de masse (en tandem)	NOAEL : <i>No observable adverse effect level</i> (dose sans effet toxique observable)
CLHP : Chromatographie liquide haute performance	NODs : Nodularine(s)
CR : Chair restante	NRPS-PKS : <i>Non ribosomal peptide synthetase - Polyketide synthase</i>
CYNs : Cyndrospermopsine (et analogues)	PCC : <i>Pasteur culture collection of cyanobacteria</i>
DAB : 2,4-diaminobutyric acid	PDA (ou DAD) : <i>Photodiode array</i> (ou <i>diode array detector</i>) (détecteur à barrettes de diodes)
DNS : Dansyl chloride	PSTs : <i>Paralytic shellfish toxins</i> (toxines paralysantes)
DoCYN : Désoxycylindrospermopsine	REPHY : Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
DW : <i>Dry weight</i> (poids sec)	ROS : <i>Reactive oxygen species</i> (espèces réactives de l'oxygène)
DL ₅₀ : Dose létale 50 %	RT : <i>Retention time</i> (temps de rétention)
ELISA : <i>Enzyme linked immunosorbent assays</i>	SIM : <i>Single ion monitoring</i>
ESI : <i>Electrospray ionisation</i> (ionisation par électronébulisation)	SMHR : Spectrométrie de masse haute résolution
FLD : Détecteur de fluorescence	SM(/SM) : Spectrométrie de masse (en tandem)
FW (ou WW) : <i>Fresh weight</i> (<i>Wet weight</i>) (poids humide)	SLA-PDC : Sclérose latérale amyotrophique – Parkinsonisme-démence complexe
GD : Glande digestive	SPE : <i>Solid phase extraction</i> (extraction sur phase solide)
FMOC : 9-fluorenylméthyl chloroformate	STX : Saxitoxine
HAB : <i>Harmful algae bloom</i>	TCA : <i>Trichloroacetic acid</i> (acide trichloroacétique)
HATX : Homoanatoxine-a	UPLC : <i>Ultra performance liquid chromatography</i>
HILIC : <i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> (chromatographie d'interaction hydrophile)	WHO : <i>World health organization</i> (organisation mondiale de la santé)
i.p. : Intrapéritonéale	
LOD : <i>Limit of detection</i> (limite de détection)	

Contexte, origines et objectifs de l'étude

Contexte

Les microalgues sont à la base des chaînes alimentaires dans les eaux douces, saumâtres et marines et soutiennent la croissance des organismes des niveaux trophiques supérieurs (e.g. Pernet et al., 2012; Lopes-Lima et al., 2014; Picoche et al., 2014). Elles sont constituées d'organismes photosynthétiques, essentiellement eucaryotes, à l'exception des cyanobactéries, procaryotes ancestraux qui ont joué un rôle clé dans l'oxygénation de l'atmosphère terrestre (Schopf 2012). Ces microalgues¹ sont ubiquitaires et de très nombreuses espèces cohabitent dans les écosystèmes aquatiques. Lorsque la combinaison de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques le permet, des espèces phytoplanctoniques peuvent proliférer de façon spectaculaire mais souvent fugace, pour donner lieu à des efflorescences (connues sous le nom anglo-saxon de blooms) visibles par la coloration de la surface de l'eau. Ce phénomène naturel est connu depuis des temps anciens. Il tend cependant à être exacerbé par l'eutrophisation croissante des systèmes aquatiques ainsi qu'avec les changements climatiques (Paerl et al., 2001 ; 2013). Or, ces proliférations excessives peuvent engendrer des effets indésirables sur les écosystèmes et leurs utilisations. D'autant plus que certaines microalgues ont la capacité de produire des molécules bioactives, les toxines (Carmichael et al., 2001).

Parmi les dizaines de milliers d'espèces de microalgues connues à ce jour, on estime que plus de 200 auraient des effets nocifs alors qu'une centaine d'espèces produiraient des toxines (ca. 30 de cyanobactéries et 80 de microalgues marines) (Graneli and Turner, 2006 ; Whitton and Potts, 2012). Lorsqu'un bloom est dominé par une espèce nuisible, on parle d'efflorescence algale nuisible (Harmful Algae Bloom, HAB) voire de cyanoHAB spécifiquement pour les cyanobactéries. Ainsi, des effets néfastes ont été rapportés pour les organismes aquatiques qui sont directement exposés à ces blooms toxiques (e.g. mortalités de poissons, de mammifères marins). L'Homme est également concerné par ces problèmes, soit via leur impact économique (e.g. interdictions de ventes des coquillages insalubres, fermeture des zones de baignade) soit via leurs conséquences sanitaires (e.g. intoxication par consommation d'eau ou d'aliments contaminés par les toxines).

Les toxines de microalgues sont des métabolites secondaires qui présentent une diversité de composés (e.g. peptides cycliques, alcaloïdes, polyéthers) aux structures chimiques variables et qui agissent via différents mécanismes de toxicité. Ainsi, parmi les toxines produites par les microalgues marines (*i.e.* dinoflagellés et diatomées), on retrouve des toxines diarrhéiques, amnésiantes ou paralysantes. Parmi les toxines de cyanobactéries (*i.e.* cyanotoxines), on distingue les hépatotoxines (microcystines et nodularines), les neurotoxines (anatoxine-a et toxines paralysantes), les cytotoxines

¹ Par la suite, le terme général microalgues sous-entend l'ensemble des organismes eucaryotes et procaryotes.

(cylindrospermospine) et les dermatotoxines (e.g. lyngbyatoxines) (annexe 1 paragraphe 2). Vue la position des microalgues dans les réseaux trophiques, les toxines qu'elles produisent peuvent donc remonter les chaînes alimentaires et notamment se concentrer dans les organismes qui les consomment directement (e.g. mollusques bivalves filtreurs, gastéropodes brouteurs ou poissons planctophages).

Les risques posés par les toxines de microalgues ont entraîné la mise en place à la fois de réseaux de surveillance et de seuils sanitaires lorsque suffisamment de données toxicologiques sont disponibles. Alors que ces seuils sont imputés aux mollusques bivalves pour les toxines de microalgues marines, ceux pour les cyanotoxines concernent les eaux de boissons et de baignades. Ainsi, les principales voies d'expositions respectives sont prises en compte. Néanmoins, à défaut de données toxicologiques suffisantes, le risque lié à la consommation d'aliments pouvant contenir des cyanotoxines n'est pas encore évalué (annexe 1 paragraphe 5). Pourtant, des cyanotoxines ont été rapportées dans des organismes aquatiques consommés par l'Homme. De plus, la présence de cyanotoxines dans l'environnement marin n'a que très récemment été étudiée alors que des cyanobactéries toxiques peuvent s'y retrouver, notamment dans les estuaires. La contamination des organismes aquatiques marins (e.g. bivalves filtreurs) est donc à envisager et nécessite d'être évaluée, surtout depuis le rapport de Miller et al. (2010) qui impute la mortalité de loutre de mer à un bloom dense de *Microcystis* sp. présent dans un lac relié à la baie de Monterey en Californie.

Même si certaines toxines de microalgues sont bien caractérisées (*i.e.* en termes d'organismes producteurs, mécanismes de toxicité et de bioaccumulation, méthodes analytiques ainsi que les risques pour les consommateurs) pour d'autres, dites émergentes, ces connaissances restent à établir. Parmi celles-ci, on peut considérer la BMAA (β -N-méthylamino-L-alanine), un acide aminé non protéique. Ses propriétés neurotoxiques (*cf.* chapitre 1 paragraphe 2.5) ont été associées aux maladies neurodégénératives comme la forme particulière de sclérose latérale amyotrophique (SLA) qui sévissait sur l'île de Guam au milieu du XX^{ème} siècle. Lors de la recherche de facteurs environnementaux pouvant expliquer la forte incidence² de cette maladie (ca. 100 fois celle de la moyenne mondiale), Vega et Bell ont découvert la BMAA en 1967, dans des graines de Cycas dont les habitants de l'île (*i.e.* les Chamorros) se nourrissaient sous forme de farine. Des questionnements (*cf.* chapitre 1 paragraphe 2.5.1) quant à la toxicité de ce composé vont ralentir les recherches jusqu'au début des années 2000.

² Selon l'INSEE, le taux d'incidence rapporte le nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période donnée par rapport à la population dont sont issus les cas. Il est un des critères les plus importants pour évaluer la fréquence et la vitesse d'apparition d'une pathologie.

A partir de 2003, des rapports du groupe « Institute for Ethomedicine », Jackson Hole, Wyoming (géré par Paul Alan Cox) vont redynamiser les travaux concernant la BMAA. En effet, ils rapportent successivement qu'elle est produite par une cyanobactérie endosymbiotique retrouvée dans les racines des cycas, puis plus généralement par 95 % des cyanobactéries et enfin, que la BMAA est présente dans le cerveau de patients décédés de maladies neurodégénératives (*i.e.* des Chamorros mais aussi des Canadiens). De plus, la BMAA existerait sous forme libre (c'est un acide aminé non protéique) mais également et en concentration beaucoup plus importante (*i.e.* facteur 10 à 240) sous forme liée aux protéines. Tous ces résultats suggèrent une large exposition à la BMAA et pas seulement sur l'île de Guam.

Dès lors, d'autres groupes (e.g. celui de Tim Downing en Afrique du sud, ceux de Ulla Rassmussen et Leopold Ilag en Suède) vont se lancer dans la recherche d'organismes producteurs, ainsi que d'un transfert trophique de ce composé. Les premiers résultats étaient assez alarmants ; la BMAA était retrouvée dans de très nombreuses souches de cyanobactéries et en concentrations élevées ; des bioaccumulations ont également été rapportées dans les écosystèmes de Floride et de la mer Baltique, avec les consommateurs de cyanobactéries qui accumuleraient la BMAA (e.g. zooplancton, bivalves, poissons).

En France, le « réseau de méthodologie coordonnée d'investigation des agrégats spatio-temporels de SLA » a mis en évidence l'existence d'un cluster de cette maladie fatale autour de la lagune de Thau en Méditerranée française, avec une prévalence³ significative chez les conchyliculteurs. Les investigations de ce groupe ont abouti à la détection de BMAA dans les huîtres et moules de cette zone conchylicole (les analyses ont été effectuées par le groupe de Cox, Masseret et al., 2013).

Cependant, des résultats plus contrastés sur la présence et les concentrations de BMAA apparaissent à partir de 2008 avec le premier rapport de la non-présence de BMAA dans des souches de cyanobactéries (Kubo et al., 2008). Ces résultats ont été obtenus avec une méthode analytique qui n'avait encore jamais été utilisée pour la BMAA : la chromatographie HILIC (Hydrophilic interaction liquid chromatography) associée à la spectrométrie de masse, surtout en tandem (*i.e.* HILIC-SM/SM). Jusqu'à maintenant, les méthodes employaient une étape de dérivation, pour rendre la molécule fluorescente et/ou la retenir sur les colonnes chromatographiques en phase inverse (*i.e.* des méthodes classiques utilisées pour l'analyse des acides aminés). La chromatographie HILIC permet la rétention des composés polaires et est donc adaptée à l'analyse de la BMAA. Plusieurs autres groupes vont confirmer la non-détection de BMAA en utilisant des méthodes HILIC-SM/SM.

³ D'après l'institut national d'études démographiques, la prévalence est le nombre de cas de maladies enregistrés pour une population déterminée et englobant aussi bien les nouveaux cas que les anciens.

Ces résultats contradictoires sont à l'origine d'une controverse analytique entourant la détection de la BMAA et ses isomères (*i.e.* débat dérivation vs. non dérivation, *cf.* chapitre 1 paragraphe 2.8.2).

En effet, cet acide aminé possède différents isomères qui ont été détectés dans des cyanobactéries ou dans des mollusques [*i.e.* le DAB (2,4-diaminobutyric acid), l'AEG (*N*-(2-aminoéthyl)glycine) et la BAMA (β -amino-*N*-méthylalanine)] et qui ont pu interférer avec l'analyse. En 2012, le groupe de Faassen (Aquatic Ecology & Water Quality Management Group, Wageningen, Pays-Bas) confirme la difficulté d'analyse de la BMAA en concluant que la détection par fluorescence est non sélective et génère des faux positifs et recommandant l'utilisation de techniques très sélectives comme la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM). Les résultats rapportés suite à l'utilisation de techniques non sélectives (e.g. détection de fluorescence) sont remis en question et notamment, la production généralisée de BMAA par les cyanobactéries.

Le sujet de la thèse, qui s'inscrit dans ce contexte très général, a pour but de contribuer au développement d'une méthode analytique sélective et fiable permettant la recherche de BMAA et ses isomères dans l'environnement marin, en vue de dresser un état des lieux de leurs présence, des microalgues productrices et des niveaux d'accumulation dans les organismes marins. De même, la présence de cyanotoxines (*i.e.* lipophiles et hydrophiles) retrouvées classiquement dans les écosystèmes dulcicoles sera évaluée pour la première fois dans les mollusques bivalves marins prélevés à différents points sur les côtes françaises métropolitaines.

Origines du sujet de thèse

Il existe peu de données au niveau international permettant de caractériser le danger lié à la bioaccumulation de cyanotoxines dans les organismes marins, consommés ou non par l'homme. De plus, à notre connaissance, aucune recherche n'est envisagée en France concernant le risque de transfert de contamination entre les eaux douces et les milieux estuariens/marins. Il s'avère donc urgent d'acquérir des données sur la bioaccumulation éventuelle des cyanotoxines dans les produits de la mer, dans un but de gestion des risques sanitaires.

En France, les recherches du « *réseau de méthodologie coordonnée d'investigation des agrégats spatio-temporels de SLA* » ont conduit à la détection de BMAA (et d'un de ses isomères le DAB) dans des moules et des huîtres collectées dans l'étang de Thau en Méditerranée (Masseret et al., 2013). Faute de laboratoires français pouvant effectuer ces analyses, les échantillons avaient été envoyés au laboratoire de Paul Alan Cox (Institute for Ethnomedicine, Jackson Hole, WY). La recherche de BMAA dans ces bivalves faisait suite aux enquêtes menées par le neurologue William Camu, du CHU de Montpellier, qui avait constaté dans la population de conchyliculteurs de Mèze (Hérault) une prévalence significative de syndromes neuro-dégénératifs de type SLA. Bien qu'il

n'existe pas de lien direct établi entre la présence de BMAA dans les coquillages de l'étang de Thau et la prévalence de la SLA chez les conchyliculteurs, ces résultats ont fait l'objet d'une communication scientifique au 22^{ème} symposium international sur les maladies neurodégénératives, à Sydney en décembre 2011 (Masseret et al., 2011).

C'est pourquoi, ce sujet de thèse a été mis en place dès 2012 par l'Ifremer. Les objectifs permettront d'acquérir des données utiles pour les autorités publiques chargées de la gestion des risques sanitaires du littoral métropolitain.

Objectifs des travaux de thèse

Les travaux de thèse ont pour objectifs de :

- (i) développer et caractériser une procédure analytique utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) pour l'identification formelle et la quantification précise de la BMAA et ses isomères ;
- (ii) mettre en culture des souches de cyanobactéries et autres microalgues potentiellement productrices de la BMAA et ses isomères, et étudier leur production ;
- (iii) étudier la présence de ces composés dans différents compartiments de la chaîne alimentaire de la lagune de Thau et plus généralement dans les mollusques bivalves en provenance de différentes zones de production des côtes françaises métropolitaines ;
- (iv) étudier la faisabilité, à l'échelle du laboratoire, de la contamination expérimentale des mollusques bivalves par des cultures de microalgues productrices de BMAA ses isomères ;
- (v) développer une procédure d'analyse par CL-SM/SM multi-cyanotoxines afin de réaliser un état des lieux de leur présence dans l'environnement marin via le criblage de mollusques bivalves et leurs périphytons (*i.e.* biofilm recouvrant les coquilles de moules de Thau).

Le chapitre 1 est dédié à l'état de l'art des thématiques abordées dans l'introduction. Un accent plus important est porté à la BMAA, une toxine qui ne peut aujourd'hui plus être seulement considérée comme une cyanotoxine (*i.e.* produite aussi par des microalgues marines). En effet, l'essentiel des travaux de cette thèse concerne ce composé et ses isomères. Nous nous sommes intéressés aux organismes qui peuvent produire ces molécules, et plus particulièrement à leurs méthodes de détection, leur présence dans l'environnement et notamment dans les organismes aquatiques dont les bivalves filtreurs. Par conséquent, l'analyse bibliographique concernant les

cyanotoxines (e.g. leurs organismes producteurs, leur toxicité, méthodes de détection, présence dans l'environnement) est présentée en annexe 1.

Le chapitre 2 correspond au développement de la méthode d'analyse de la BMAA et de ses isomères par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les contraintes de l'analyse de cette petite moléculaire polaire soulevées par l'analyse bibliographique ont été prises en compte. Chaque étape, de l'extraction à l'analyse, a été optimisée afin de permettre une identification formelle et une quantification exacte. Par la suite, la méthode développée a été appliquée à des cultures de cyanobactéries réalisées au laboratoire, ainsi qu'à des mollusques de l'étang de Thau collectés en 2009.

Le chapitre 3 est divisé en 2 parties. Dans la première, la présence de BMAA et ses isomères dans certains compartiments de l'écosystème de Thau (plancton, périphyton, moule) a été évaluée sur une fréquence mensuelle couvrant la période juillet 2013 – octobre 2014. La présence de BMAA dans le seston nous a conduits à mettre en culture des microalgues marines isolées de la lagune (e.g. picocyanobactéries, dinoflagellés, prasinophycée) mais également d'autres microalgues que l'on peut retrouver dans cet environnement (*i.e.* diatomées).

Ensuite la présence de BMAA et ses isomères dans des mollusques bivalves de l'ensemble des côtes françaises métropolitaines a été évaluée, via le criblage des échantillons collectés mensuellement en 2013 par le système de vigilance du réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) de l'Ifremer. La recherche d'organismes producteurs de BMAA et ses isomères a été poursuivie (e.g. autres espèces de diatomées et dinoflagellés, cryptophytes).

Le chapitre 4 correspond à la contamination en conditions contrôlées de moules (*Mytilus edulis*) nourries avec une culture de diatomée (*i.e.* *Phaeodactylum tricornutum*) contenant de la BMAA. Nous avons tout d'abord étudié les cinétiques de production de BMAA et de son isomère le DAB dans quatre souches de diatomées qui s'étaient révélées positives lors de nos criblages d'organismes produisant la BMAA (*i.e.* article 2). Ensuite les moules ont été exposées à *Phaeodactylum tricornutum* et à *Tisochrysis lutea* (*i.e.* respectivement une alimentation avec et sans BMAA) pendant 5 jours et leurs teneurs en BMAA et isomères ont été évaluées et comparées à celles des moules non nourries.

Le Chapitre 5 aborde le développement de la procédure analytique multi-cyanotoxines par CL-SM/SM pour l'analyse de microalgues et mollusques bivalves marins. Deux méthodes distinctes

ont été optimisées et mises en place : une pour les cyanotoxines lipophiles (microcystines et nodularine) et l'autre pour les cyanotoxines hydrophiles (cylindrospermopsines, anatoxines-a, saxitoxine). Cette procédure a été ensuite appliquée sur les échantillons de 2013 du réseau de vigilance du REPHY (*i.e.* mollusques) ainsi que les périphytons prélevés sur les moules de Thau. Ce travail considéré annexe par rapport aux travaux effectués sur la BMAA est présenté en annexe 2

Le développement de la méthode d'analyse de la BMAA et de ses isomères nous permettra de répondre aux questions suivantes : 1) Est-ce que les microorganismes photosynthétiques des milieux côtiers produisent de la BMAA ou ses isomères ? 2) Il y a-t-il un transfert et bioaccumulation de ces molécules dans le réseau trophique marin et tout particulièrement dans les mollusques bivalves ? 3) Quel est le niveau d'occurrence de ces molécules dans les zones conchylicoles des côtes françaises ?

Par la suite, le contexte sera rappelé pour chacun des chapitres, ainsi que les objectifs détaillés et l'approche méthodologique qui a été mise en œuvre.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Par la suite, une attention plus particulière sera portée aux cyanobactéries puisque ce manuscrit traite en partie des toxines produites par ces procaryotes (*i.e.* cyanotoxines). Mais certaines espèces de microalgues marines comportent également des espèces toxiques (*i.e.* diatomées et dinoflagellés) et notamment productrices de BMAA, la toxine la plus étudiée dans ce travail.

Les cyanobactéries sont majoritairement présentes dans les eaux douces et saumâtres alors que les dinoflagellés et les diatomées sont davantage retrouvés dans l'environnement marin (figure 1). Le tableau 1 résume quelques caractéristiques de ces trois classes de microalgues.

Tableau 1 : quelques caractéristiques morphologiques et cytologiques pour les cyanobactéries, dinoflagellés et diatomées. Adapté de Abdennadher (2014).

	Cyanobactérie (procaryote)	Dinophycée (eucaryote)	Bacillariophycée (eucaryote)
Pigments	Chlorophylle a, Phycobilines (phycocyanine, allophycocyanine, phycoerythrine)	Chlorophylle a et c2, xanthophylle (péridinine, diadinoxanthine)	chlorophylle a, c1, c2 et c3, xanthophylle, fucoxanthine, diatoxanthine,
Substances de réserve	Glycogène, cyanophycine	Amidon, lipide	Chrysolaminarine, lipide
Paroi cellulaire	Peptidoglycane (gram-négatifs)	Cellulose (<i>i.e.</i> thèque, quand présente)	Silice (<i>i.e.</i> frustule)
Morphologie	Unicellulaires, coloniales, filamenteuse...	Principalement unicellulaires (nues ou avec thèque), 2 flagelles	Pennées (symétrie bilatérale) Centriques (symétrie radiale)
Reproduction	Asexuée (division binaire, bourgeonnement)	Asexuée et sexuée	Asexuée et sexuée
Nombre d'espèces	2000 – 6280 ¹ (2698 décrites)	2294 ²	30 000 – 100 000 ³

¹ Nabout et al., 2013 ; ² Gómez, 2012 ; ³ Mann and Vanormelingen, 2013

Les cyanobactéries sont des procaryotes à Gram-négatif qui seraient apparus il y a environ 3,5 milliards d'années sur Terre (Schopf, 2012). Elles possèdent différents pigments (e.g. la phycocyanine à l'origine de leur couleur bleutée et leur appellation « algues bleues ») qui leur permettent de réaliser la photosynthèse oxygénique. Les autres microalgues dont les dinoflagellés et les diatomées seraient apparues plus tardivement, à la suite d'une ou plusieurs endosymbioses, dont la première entre un hôte eucaryote et une cyanobactérie, fournissant ainsi à ce premier les plastes nécessaires à la réalisation de la photosynthèse (Delwiche, 1999).

Les microalgues sont une source principale d'oxygène sur Terre et en tant que producteurs primaires, elles constituent le premier maillon trophique des chaînes alimentaires aquatiques.

Cependant, lorsque les conditions sont favorables, certaines de ces espèces peuvent former des efflorescences (*i.e.* fortes proliférations en surface ou blooms, *cf.* paragraphe 1.2). Cette surabondance peut engendrer des impacts environnementaux et sanitaires, notamment en raison de la capacité de certaines espèces à produire des métabolites secondaires ayant une activité biologique nocive, les toxines (Paerl and Otten, 2013).

1.2. Prolifération des microalgues nuisibles

Les microalgues sont cosmopolites et par conséquent, présentes dans toutes les masses d'eau. Leur prolifération est naturelle. Cependant, l'eutrophisation croissante des milieux aquatiques tend à accentuer ce phénomène. Ainsi, les cyanobactéries, mais aussi les autres microalgues, présentent des stratégies écophysiologiques qui leur permettent d'exploiter les modifications anthropogéniques de leurs environnements et notamment les apports excessifs de nutriments (e.g. azote et phosphore). Il est en effet admis que le phosphore et l'azote seraient des éléments limitants la production de biomasse algale dans les écosystèmes dulcicoles et marins (*i.e.* eaux côtières) (Herbert, 1999; Dagenais-Bellefeuille and Morse, 2013; Paerl and Otten, 2013). Un signe visible de ce succès est l'augmentation de la fréquence des blooms de cyanobactéries toxiques ou nuisibles (HABs, Harmful Algae Blooms) (Smith, 2003; Heisler et al., 2008; Paerl and Otten, 2013).

Il n'y a pas de définition internationale ou de quantification de ce qu'est un bloom (Merel et al., 2013b). Il peut être considéré comme une production de biomasse significative, sur une courte période, associée à une diminution de la diversité phytoplanctonique (*i.e.* en réalité les blooms sont souvent mono-spécifiques). Oliver and Ganf (2000) ont néanmoins fixé une limite de 20 000 cellules.mL⁻¹ pour définir un bloom de cyanobactérie, mais ces proliférations peuvent être très denses et compter 10⁵ – 10⁶ cellules.mL⁻¹ (Serrano et al., 2004; Saito et al., 2005; McGregor et al., 2012).

L'apparition et le contrôle des blooms de cyanobactéries sont multifactoriels (*i.e.* interactions de facteurs physiques, chimiques et biotiques) (figure 2). Les conditions optimales correspondent globalement à une concentration élevée de nutriments (e.g. phosphore et/ou azote), associée à une luminosité adéquate, un temps de résidence dans l'eau suffisamment important pour atteindre des taux de croissance élevés et une faible prédation. Ces conditions sont valables pour les autres microalgues également.

Même si les blooms de cyanobactéries sont majoritairement retrouvés dans les milieux dulcicoles, certaines espèces peuvent former des efflorescences dans le milieu marin [e.g. *Nodularia spumigena* en mer Baltique (Kahru et al., 1994), *Trichodesmium* dans les océans tropicaux oligotrophes (Capone et al., 1997) alors que les picocyanobactéries des genres *Synechococcus* et *Prochlorococcus* seraient présentes dans tous les océans (Scanlan, 2012)].

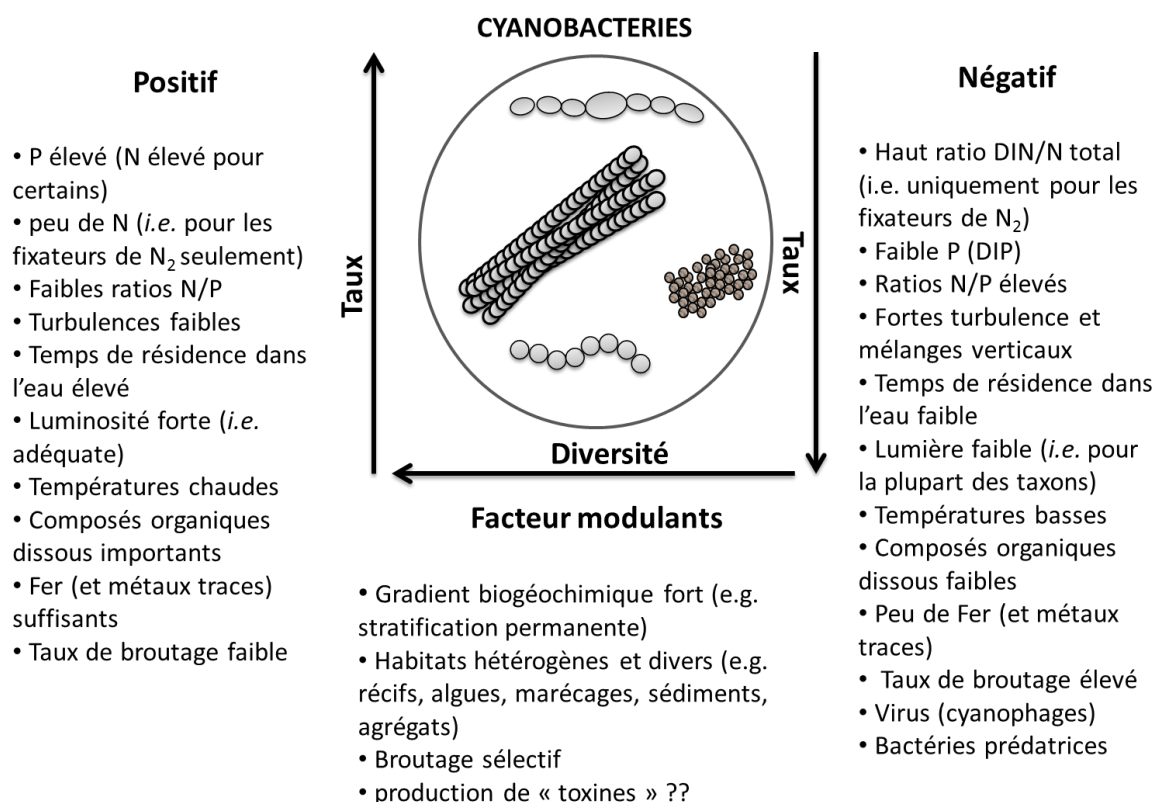


Figure 2 : facteurs (positifs et négatifs) qui influencent la formation de blooms de cyanobactéries toxiques dans les écosystèmes aquatiques (Paerl and Otten, 2013).

Néanmoins, en milieux côtiers, il semblerait que ce soient plutôt les diatomées et les dinoflagellés qui peuvent former des efflorescences, lorsque les conditions sont favorables. En France métropolitaine, l'observation des populations phytoplanctoniques marines est assurée depuis 1984 par l'Ifremer dans le cadre du réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY). A titre d'exemple, il a été mis en évidence un nombre moyen de 300 blooms de microalgues par an sur l'ensemble du littoral entre 2007 et 2012 (*i.e.* $> 100\,000$ cellules.mL⁻¹ voire $> 10^6$ cellules.mL⁻¹ pour 26 % des cas) dont les trois-quarts impliquent des espèces de diatomées (e.g. *Pseudo-nitzschia* spp., *Chaetoceros* spp. et *Skeletonema costatum*) (Ifremer, 2012). Généralement, les blooms de diatomées et

de dinoflagellés sont alternés (e.g. au printemps et à l'automne pour les diatomées, en été pour les dinoflagellés) ce qui traduit leurs différentes niches et physiologies.

Bien que les microalgues aient un rôle écologique essentiel, leurs proliférations peuvent entraîner des impacts négatifs multiples. Notamment, lorsqu'un bloom est dominé par une espèce productrice de toxines, il y a un risque sanitaire potentiel. Plus de 200 espèces de phytoplancton seraient nocives (Van Donk et al., 2011). Parmi celles-ci, il y aurait une trentaine d'espèces de cyanobactéries (Whitton and Potts, 2012) alors que dans le milieu marin, environ 80 sont connues pour produire des toxines (Graneli and Turner, 2006).

Le tableau 2 recense certaines espèces de microalgues, d'eaux douces et marines, qui ont la capacité de produire des toxines. Ainsi, ce sont surtout des espèces de dinoflagellés qui sont toxiques dans le milieu marin, alors que les cyanobactéries produisent la plupart des toxines retrouvées en eau douce. Les toxines paralysantes, dont la saxitoxine, sont une particularité. Elles sont en effet produites conjointement par des dinoflagellés et des cyanobactéries.

Tableau 2 : exemples de microalgues toxiques, type de toxine et environnement dans lequel elles sont retrouvées

Groupe de toxine	Organismes producteurs (classe)	Environnement	Type de toxine
Acide domoïque	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp. (diatomée)	Marin	Toxine amnésiante
Acide okadaïque	<i>Dinophysis</i> spp., <i>Prorocentrum</i> spp. (dinoflagellés)	Marin	Toxine diarrhéique
Azaspiracides	<i>Azadinium</i> spp. (dinoflagellés)	Marin	Toxine diarrhéique
Saxitoxine	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Gymnodinium catenatum</i> (dinoflagellés)	Marin	Toxine paralysante
	<i>Anabaena circinalis</i> , <i>Lyngbya wollei</i> (cyanobactéries)	Eau douce	
Microcystines	<i>Microcystis</i> spp., <i>Anabaena flos-aquae</i> (cyanobactéries)	Eau douce Marin ?	Hépatotoxine
Cylindrospermopsine	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon olivasporum</i> (cyanobactéries)	Eau douce	Cytotoxine
Homoanatoxine-a	<i>Hydrocoleum lyngbyaceum</i> (cyanobactérie)	Marin	Neurotoxine

Les risques sanitaires et environnementaux, liés aux efflorescences algales dans les eaux douces et marines, sont donc bien réels.

L'analyse bibliographique concernant les cyanotoxines est présentée en annexe 1.

2. β -*N*-methylamino-L-alanine (BMAA) et isomères

La β -*N*-méthylamino-L-alanine (BMAA) est un acide aminé non protéique (figure 3). Trois isomères ont été décrits à ce jour : le 2,4-diaminobutyric acid (DAB), la *N*-(2-aminoéthyl)glycine (AEG) et la β -amino-*N*-méthylalanine (BAMA).

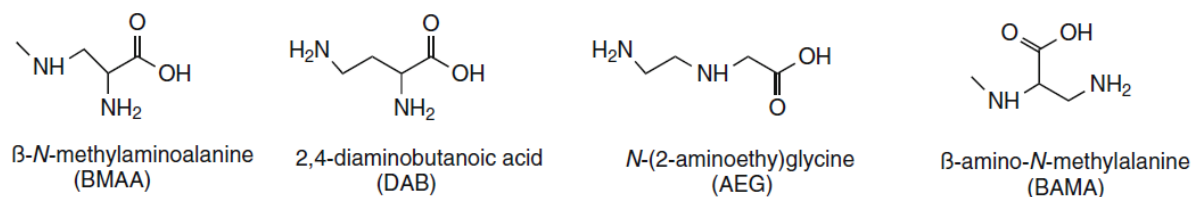


Figure 3 : structure de la BMAA et trois de ses isomères naturels, le DAB l'AEG et la BAMA (Jiang et al., 2012).

La BMAA a été découverte en 1967 sur l'île de Guam (Vega and Bell, 1967), dans des graines de *Cycas circinalis* (aujourd'hui appelé *Cycas micronesica* K.D. Hill). Cette découverte résulte de la recherche de facteurs environnementaux pouvant expliquer la forte incidence d'une maladie neurodégénérative particulière sur l'île, associant la sclérose latérale amyotrophique (SLA) avec des symptômes de type maladie de Parkinson et démence (PDC, Parkinsonisme-démence complexe), d'où l'appellation SLA-PDC.

Le DAB est un constituant de la paroi de certaines bactéries (Groth et al., 1996) mais rapporté pour la première fois en 2008 dans la cyanobactérie *Calothrix* sp. PCC7103 (Rosen and Hellenas, 2008). La découverte des deux derniers isomères provient de la réflexion de certains groupes sur l'existence de molécules qui pourraient interférer avec l'analyse de la BMAA. Ainsi, l'AEG a été mentionnée puis effectivement détectée par Banack et al. (2011 et 2012) et la BAMA par Jiang et al. (2012).

2.1. Organismes producteurs

Depuis la découverte de la BMAA et de ses isomères, différents organismes ont été qualifiés de producteurs (*i.e.* d'un seul, deux voire de trois acides aminés non protéiques).

2.1.1. Cycadaceae et autres plantes

La BMAA a été découverte dans des graines de cycas dans les années 60. La détection de BMAA dans ces plantes arborescentes qui constitueraient de véritables fossiles vivants (Brenner et al., 2003) a été de nombreuses fois confirmées depuis (Brenner et al., 2003; Cox et al., 2003; Rosen and Hellenas, 2008; Marler et al., 2010). Aujourd'hui, *Cycas micronesica* est susceptible de disparaître à cause de

différents parasites, et a été placé sur liste rouge des espèces menacées (Marler et al., 2010). Néanmoins, il semblerait que d'autres espèces de cycas comme *Cycas revoluta* (Spáčil et al., 2010; Fan et al., 2014) et *Cycas debaoensis* (McCarron et al., 2014) puissent aussi produire de la BMAA.

Les isomères DAB et AEG ont également tous deux été détectés dans *Cycas debaoensis* (McCarron et al., 2014) qui finalement produit les trois acides aminés. Le DAB a spécifiquement été aussi rapporté dans de nombreuses espèces d'angiosperme (e.g. *Lathyrus latifolius* ou *Brassica oleracea*, respectivement pois vivace et chou) (Banack et al., 2010b; Krüger et al., 2010; Spáčil et al., 2010) ainsi que dans certaines plantes aquatiques (Al-Sammak et al., 2014) et d'autres prélevées dans des champs (McGorum et al., 2015).

Ces observations montrent que la BMAA et ses isomères peuvent être produits par de nombreuses espèces de végétaux. Les plantes sont en effet connues pour leur capacité à produire des acides aminés non protéiques [e.g. canavanine, voir la revue de Huang et al. (2011)]. Certaines de ces espèces possèdent des cyanobactéries endosymbiotiques, ce qui rend parfois l'identité de l'organisme producteur ambiguë (Kruger et al., 2012).

2.1.2. Cyanobactéries

La présence de BMAA dans une cyanobactérie symbiotique diazotrophe (*i.e.* *Nostoc* sp.) isolée à partir des racines d'un *Cycas micronesica* (figure 4) a été à l'origine du regain d'intérêt pour la BMAA au début des années 2000 (Cox et al., 2003).

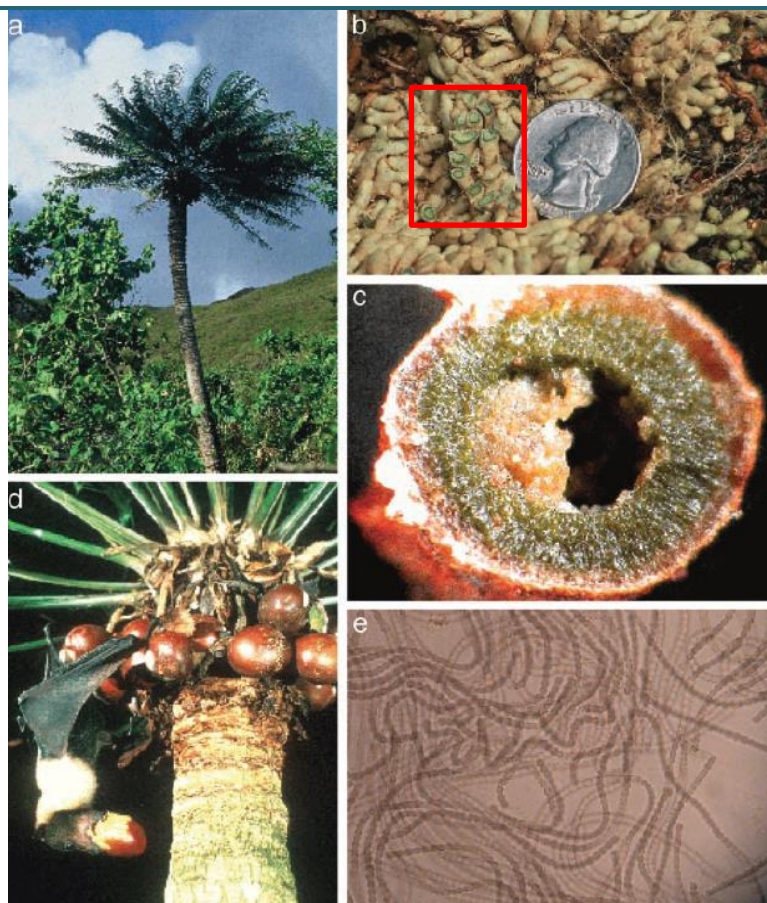


Figure 4 : photographies de (a) un *Cycas micronesica*, (b) des racines coralloïdes de cet arbre, le cadre rouge montrant la présence de cyanobactéries dans la coupe réalisée, (c) une section des racines dévoilant un anneau vert correspondant à la cyanobactérie endosymbiotique, (d) une chauve-souris se nourrissant des graines et (e) d'une culture de *Nostoc* sp. isolée à partir des racines. Repris de Cox et al. (2003).

Ce même groupe a par la suite rapporté de fortes concentrations de BMAA (*i.e.* jusqu'à 6700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec ou dry weight, DW) dans 95 % des 41 souches de cyanobactéries qui ont été criblées (Cox et al., 2005). Ces souches ayant été choisies pour être représentatives de différents écosystèmes (*e.g.* marin, limnique et terrestre) et de l'ensemble des cinq ordres définis selon Rippka et al. (1979), les auteurs ont émis l'hypothèse que la production de BMAA pourrait être une caractéristique commune aux cyanobactéries. Dès lors, l'intérêt pour la production de BMAA par les cyanobactéries a pris une autre dimension et de nombreuses équipes se sont lancées dans cette thématique de recherche. Les études qui ont suivi confirmaient cette tendance d'une production générale par les cyanobactéries mais en concentrations très variables selon les méthodes utilisées (*i.e.* jusqu'à un facteur 10 000) (Esterhuizen and Downing, 2008; Metcalf et al., 2008; Jonasson et al., 2010; Cervantes Cianca et al., 2012).

Cependant, avec l'accès à des méthodes plus sélectives et l'utilisation de nouvelles techniques analytiques, des résultats plus contrastés ont été rapportés à partir de 2008. En effet, plusieurs études successives font état d'une absence de BMAA alors qu'un grand nombre d'espèces (*i.e.* > 70) ont été criblées (Kubo et al., 2008; Krüger et al., 2010; Faassen et al., 2012a). Ce constat a entraîné des débats autour des méthodes d'analyse et une interrogation sur la nature des molécules réellement quantifiées dans les études précédentes (Krüger et al., 2012) (*cf.* paragraphe 2.8.2).

Malgré le développement et la validation de plusieurs méthodes très sélectives et sensibles pour l'analyse de la BMAA, aucun criblage récent d'un nombre élevé de cyanobactéries n'a été réalisé. Néanmoins, deux espèces (*i.e.* *Nostoc* sp. PCC 7120 et *Leptolyngbya* sp. PCC 73110) ont été confirmées comme productrices de BMAA, en concentrations relativement faibles (*i.e.* < 1 µg.g⁻¹ DW) (Berntzon et al., 2013; Jiang et al., 2013).

Concernant les isomères de la BMAA, après Rosen and Hellenas (2008), le DAB a été observé à de nombreuses reprises (Krüger et al., 2010; Spáčil et al., 2010; Li et al., 2012; Fan et al., 2014; McCarron et al., 2014) alors que l'AEG, analysé depuis moins longtemps, a été rapporté dans quelques souches seulement (Banack et al., 2012; Jiang et al., 2013; McCarron et al., 2014).

La production de BMAA par l'ensemble des cyanobactéries, qui était communément admise, a donc été remise en question. A l'inverse, le DAB et dans une moindre mesure l'AEG ont plus régulièrement été détectés ces dernières années. Finalement, la BMAA, le DAB et l'AEG seraient potentiellement produits par certaines cyanobactéries, parfois les trois isomères par la même souche (*e.g.* *Leptolyngbya* sp. PCC 73110).

2.1.3. Autres microalgues

Plus récemment, la présence de BMAA dans des mollusques marins relativement peu exposés à des cyanobactéries a conduit certains groupes suédois et portugais à analyser des espèces de microalgues marines représentatives de l'environnement de ces bivalves. Ainsi, une dizaine de souches de diatomées (dont certaines caractéristiques de la mer Baltique et d'autres ubiquitaires) et deux de dinoflagellés (*i.e.* *Heterocapsa triquetra* sp. et *Gymnodinium catenatum* IO.13.20) produiraient de la BMAA et parfois ses deux autres isomères (Jiang et al., 2014a; Jiang and Ilag, 2014; Lage et al., 2014) (voir tableau 3).

La découverte de BMAA et ses isomères dans des microalgues marines est importante car elle suggère de nouvelles voies d'exposition pour les organismes aquatiques. Cependant, ces résultats récents restent à confirmer par d'autres groupes.

Le tableau 3 dresse une liste des organismes phytoplanctoniques ayant été confirmés producteurs de BMAA, DAB et AEG à ce jour. Seuls les résultats des études ayant utilisé des méthodes très sélectives (*i.e.* CL-SM/SM) et fournissant les chromatogrammes ont été pris en compte (voir explications dans le paragraphe 2.8.2 « controverse analytique et conséquences »).

Tableau 3 : Espèces de microalgues (procaryotes et eucaryotes) confirmées comme productrices de BMAA et isomères.

Organisme	Espèce (référence)	Isomères	Réf
Cyanobactéries	<i>Leptolyngbya</i> sp. (PCC 73110)	BMAA, DAB et AEG	1 et 2
	<i>Nostoc</i> sp. (PCC 7120)	BMAA	3
Dinoflagellés	<i>Heterocapsa triquetra</i>	BMAA, DAB et AEG	4
	<i>Gymnodinium catenatum</i> (IO.13.20)	BMAA, DAB et AEG	5
Diatomées	<i>Skeletonema marinoi</i> (SAAE08603)	BMAA, DAB et AEG	6
	<i>Skeletonema marinoi</i> (ST28)	BMAA, DAB et AEG	
	<i>Thalassiosira</i> sp. (CCAP 1085/15)	BMAA, DAB et AEG	
	<i>Achnanthes</i> sp. (CCAP 1095/1)	BMAA, DAB et AEG	
	<i>Navicula pelliculosa</i> (CCAP 1050/9)	BMAA et AEG	7
	<i>Coscinodiscus granii</i> (SCCAP K-1831)	BMAA	
	<i>Chaetoceros socialis</i> (SCCAP K-0550)	BMAA	
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (SCCAP K-1280)	BMAA	

1 : Jiang et al., 2013 ; 2 : Spáčil et al., 2010 ; 3 : Berntzon et al., 2013 ; 4 : Jiang and Ilag, 2014 ; 5 : Lage et al., 2014 ; 6 : Jiang et al., 2014a ; 7 : Lage et al., 2015.

2.2. Voie de biosynthèse

Contrairement à la plupart des cyanotoxines, la voie de biosynthèse de la BMAA par les cyanobactéries n'a pas été élucidée à ce jour. En se basant sur des séquences de gènes exprimés obtenues à partir des ARNm, Brenner et al. (2003) ont proposé une voie de biosynthèse chez *Cycas rumphii*. Elle implique d'abord une enzyme de type cystéine-synthase puis une méthyltransférase pour transférer successivement un groupement NH₃ sur une alanine β substituée puis un méthyle sur l'amine de l'intermédiaire métabolique formé (figure 5).

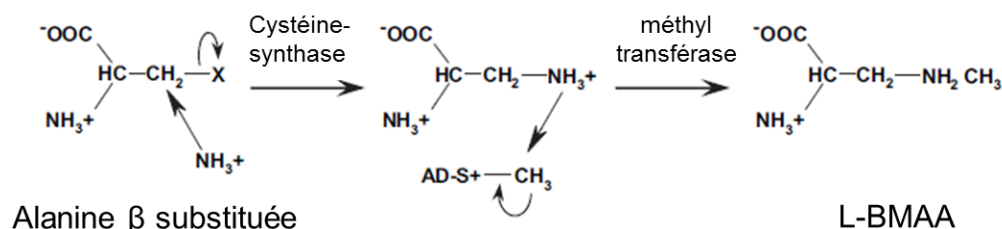


Figure 5 : voie de biosynthèse prédite de la BMAA par Brenner et al. 2003. Repris de Araoz et al. (2010). AD-S⁺ : S-adenosyl-L-méthionine.

Cette biosynthèse en deux étapes a par la suite été jugée plausible pour les cyanobactéries (*i.e.* elles possèdent les gènes orthologues codant pour ces enzymes) (Araoz et al., 2010) mais n'a pas été confirmée. Cependant, au 11th International Conference on Plant Medicine, Jackson Hole, WY, USA (10-17 Octobre 2014) organisé par Paul Alan Cox ; Peter Nunn a fait une présentation dans laquelle il suggérait que la synthèse de BMAA sous forme libre semblait improbable chez les cyanobactéries (*e.g.* il manquerait des enzymes et/ou les précurseurs potentiels). A l'inverse, une synthèse par voie non ribosomale, comme pour les cyanotoxines, pourrait donner des peptides avec une liaison peptidique méthylée (Walsh et al., 2013) et donc indirectement de la BMAA. Néanmoins, cette hypothèse est purement théorique et manque de preuves génétiques et métaboliques à ce jour.

A notre connaissance, aucune information n'est disponible pour les isomères de la BMAA. Cependant, un gène codant pour le DAB a été retrouvé chez la bactérie *Acinetobacter baumannii* (Ikai and Yamamoto, 1997). De plus, il a été suggéré que l'AEG serait un monomère des peptides d'acides nucléiques qui auraient été utilisés par les organismes primitifs pour la transmission d'informations génétiques (Nielsen, 1993). Sa présence dans les cyanobactéries apparues il y a plus de trois milliards d'années confirmerait cette hypothèse, d'autant plus que l'AEG n'avait pas été observée naturellement avant l'étude de Banack et al. (2012).

Les voies de biosynthèse de la BMAA et ses isomères ne sont donc pas élucidées. Alors qu'il n'y a pas de consensus sur les souches de cyanobactéries produisant de la BMAA, sa présence confirmée dans *Thalassiosira* sp. et *Phaeodactylum tricornutum* est particulièrement intéressant pour l'étude de sa biosynthèse puisque ces diatomées ont été séquencées (Armbrust et al., 2004; Bowler et al., 2008).

2.3. Facteurs favorisant la production de BMAA par les microalgues

Peu d'études se sont intéressées aux conditions favorisant la production de BMAA et ses isomères par les microalgues, dont les cyanobactéries. Un seul groupe a effectué des travaux à ce sujet, d'abord sur des cultures de cyanobactéries puis dans des échantillons naturels. Leur première étude suggère qu'un stress azoté est requis pour que des cyanobactéries unicellulaires non diazotrophes produisent de la BMAA (Downing et al., 2011). En effet, la BMAA était détectée dans *Synechococcus* sp. J341 et *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 seulement après que les cellules soient carencées en azote, ce qui laissait supposer qu'elle n'était pas synthétisée *de novo* en même temps que les autres acides aminés. Le délai d'apparition de BMAA était plus long dans les cyanobactéries qui avaient été cultivées plus longtemps avec de l'azote en concentration non limitante.

Le même groupe a récemment réaffirmé qu'il existait un lien entre la production de BMAA et la quantité d'azote disponible dans l'environnement, suite à une étude terrain dans le barrage d'Hartbeespoort en Afrique du Sud (Scott et al., 2014). Au cours de leur suivi de blooms de cyanobactéries, ils ont constaté que la concentration de BMAA était négativement corrélée à la présence d'azote dans le milieu. Selon eux, si la concentration en azote dépassait 36 μM , la BMAA n'était pas détectée.

Downing et al. (2011) ont donc conclu que le fait que les cyanobactéries soient rarement cultivées dans des milieux sans azote pouvait expliquer les rapports contradictoires de production de BMAA par les cyanobactéries en culture, alors qu'elle serait plus fréquemment détectée dans des échantillons prélevés dans l'environnement comme observé par Faassen et al. (2009) et Jiang et al. (2014a).

Cependant les résultats de leur première étude ont par la suite été critiqués puisque ce même groupe avait auparavant retrouvé de grandes quantités de BMAA dans de nombreuses souches des cyanobactéries cultivées dans un milieu riche en azote, sans hypothèse pour expliquer ces différences (Faassen, 2014). De même, la détection de BMAA dans *Leptolyngbya* sp. PCC 73110 par Jiang et al. (2013) est contradictoire puisque cette souche était cultivée dans du BG11, un milieu classique riche qui contient près de 500 fois plus d'azote que la limite de 36 μM proposée par (Scott et al., 2014).

La production de BMAA par de nombreuses cyanobactéries n'est pas confirmée à ce jour. Ceci est en grande partie dû à la controverse analytique entourant la détection de cette toxine (*cf.* paragraphe 2.8.2). De ce fait, l'étude des facteurs impactant la production de BMAA est compliquée.

Néanmoins, les récentes découvertes de BMAA dans les dinoflagellés et surtout les diatomées, avec une production caractérisée « constante au cours du temps » par Jiang et al. (2014a) amèneront peut-être de nouvelles études sur les facteurs contrôlant la production de BMAA par les microalgues de façon générale.

2.4. Rôle de la BMAA

La présence généralisée de BMAA dans les cyanobactéries laissait supposer un rôle important puisque ces organismes sont apparus sur Terre il y a plus de trois milliards d'années. Le groupe de Timothy Downing est à l'origine des principaux travaux qui ont été effectués à ce sujet, comme c'était le cas pour les facteurs qui influencent la production de BMAA par les cyanobactéries.

Dans leur première étude, Downing et al. (2011) ont suggéré que la BMAA jouerait un rôle dans le métabolisme de l'azote des cyanobactéries non diazotrophes qui la produisent (*i.e.* elle serait un métabolite intermédiaire produit lors d'un stress azoté). Par la suite, Downing et al. (2012) ont étudié l'effet de BMAA et DAB exogènes sur *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ils ont observé une diminution voire une inhibition de la croissance cellulaire (à 4,2 et 42 μM respectivement) associée à une chlorose (*i.e.* perte de coloration associée à la dégradation des pigments). Les travaux de Berntzon et al. (2013) ont confirmé ces observations sur *Nostoc* sp. PCC 7120, avec une concentration de BMAA similaire. De plus, chez cette cyanobactérie diazotrophe, la BMAA et le DAB inhiberaient fortement la fixation d'azote atmosphérique par une action directe sur l'activité de la nitrogénase (e.g. interaction avec le métabolisme de la glutamine qui engendrerait une accumulation de NH_4^+ et un arrêt de l'activité de la nitrogénase dans les hétérocytes). Néanmoins, dans cette étude, des granules de glycogène caractéristiques d'un stress azoté ont été observés, ce qui pourrait expliquer la chlorose et l'inhibition de croissance rapportées dans ces deux études.

La BMAA ne peut donc pas être utilisée comme une source d'azote. Elle serait un composé toxique qui inhibe la croissance d'autres cyanobactéries si elle est produite en concentration importante ($> \mu\text{M}$), et ce même pour ses propres producteurs. Plusieurs études ont montré que de la BMAA exogène induit différents effets sur les organismes aquatiques, ce qui pourrait renforcer son rôle de molécule de défense. Par exemple, un stress oxydatif indirect lié à une altération des enzymes anti-oxydantes a été observé chez des plantes aquatiques et deux des quatre espèces de moules d'eau douce testées, à des concentrations de l'ordre de 100 ng.mL^{-1} (Esterhuizen-Londt et al., 2011b; Contardo-Jara et al., 2013;

Contardo-Jara et al., 2014). Chez *Danio rerio*, Purdie et al. (2009) ont observé différentes anomalies de développement et neuro-musculaires tandis que la survie, la mobilité et le cycle de reproduction de *Daphnia magna* sont également impactés (Lürling et al., 2011).

A l'inverse, Downing et al. (2015) suggèrent que la BMAA aurait un effet physiologique bénéfique pour des cyanobactéries présentes dans le désert. En effet, son rôle dans la réduction de l'activité photosynthétique permettrait de diminuer la quantité d'espèces réactives de l'oxygène engendrées par les fortes intensités lumineuses. Ainsi, la BMAA aurait un rôle de photoprotection dans certaines conditions, et permettrait de maintenir l'intégrité métabolique des cyanobactéries.

Comme pour la plupart des toxines produites par les microalgues, un rôle physiologique et de défense ont été suggérés conjointement pour la BMAA (Holland and Kinnear, 2013). Néanmoins dans ces études, des concentrations relativement fortes de BMAA ont été utilisées par rapport aux concentrations rapportées dans l'environnement et dans les cultures de microalgues.

2.5. Toxicité

2.5.1. *In vivo*

Différents modèles de vertébrés, et dans une moindre mesure d'invertébrés, ont été utilisés pour étudier la toxicité de la BMAA (Karamyan and Speth, 2008) alors que la toxicité sur les organismes aquatiques n'a été considérée que récemment. Le tableau 4 résume quelques résultats intéressants obtenus à ce jour.

Entre la découverte de la BMAA en 1967 et jusqu'en 2009, de nombreuses études *in vivo* confirment des troubles neurologiques mais majoritairement en toxicité aigüe (Karamyan and Speth, 2008), c'est-à-dire incompatible avec l'apparition lente et progressive des maladies neurodégénératives auxquelles la BMAA serait associée.

La seule étude dans laquelle des effets chroniques compatibles avec les maladies neurodégénératives ont été rapportés avant 2009 est celle de Spencer et al. (1987) qui ont étudié l'effet de la BMAA sur les primates par gavage ($100\text{--}315 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ sur 12 semaines). Ils ont remarqué des évidences cliniques neurophysiologiques et neuropathologiques d'un trouble du système moteur soit des symptômes compatibles avec l'étiologie de la SLA-PDC. Cependant, cette étude a été vivement

critiquée, d'abord concernant les concentrations utilisées, considérées beaucoup trop élevées et donc non pertinentes (Duncan et al., 1988; Duncan et al., 1990) et car elle n'a pas pu être reproduite chez la souris, avec des concentrations jugées pourtant similaires (Perry et al., 1989).

Tableau 4 : exemples d'études toxicologiques *in vivo*. La voie d'exposition, l'organisme, la concentration et la durée d'exposition ainsi que les effets observés sont rapportés. Basé sur Karamyan et Speth (2008) et Chiu et al. (2011) et complété avec les données récentes.

Voie d'exposition	Organismes	Concentration / durée d'exposition	Effets observés	Référence
i.p.	Poule	200 – 800 mg/kg	Faiblesses, convulsions et incoordination	Vega et Bell, 1967
Gavage	Singe	100 – 315 mg/kg/jour ≤ 12 semaines	Dysfonctionnement du système moteur, caractéristiques d'un parkinsonisme et anomalies comportementales	Spencer et al., 1987
Gavage	Souris	500 mg/kg/jour (18 jours) puis 500 mg/kg 1 jour sur 2 (28 jours) et 1000 mg/kg 1 jour sur 2 (30 jours)	Pas d'effets sur le comportement, ni de changements physiologiques	Perry et al., 1989
Alimentation	Souris	28 mg/kg/jour 30 jours	Aucun trouble moteur, cognitif ou neuropathologique	Cruz-Aguado et al 2006
Injection i.v. et sous cutanée	Souris	7,3 µg/kg BW 200-600 mg/kg BW	Passage transplacentaire et de la barrière hémato-encéphalique sur les souris néonatales, troubles aigus du comportement des nouveaux-nés	Karlsson et al 2009
BMAA dissoute	Poisson (<i>Danio rerio</i>)	5 – 50 000 µg/L Avec/sans bicarbonate 5 jours	Anomalies neuromusculaires et de développement associés à la voie glutamatergique, effets potentialisées par l'ajout de carbonate	Purdie et al., 2009
Alimentation	Drosophile	0 – 10 mM 7, 14 ou 21 jours	Durée de vie peu affectée mais apparition de troubles neurologiques retardés chez l'adulte. Effets corrélés à la concentration de BMAA dans l'organisme	Zhou et al 2010
BMAA dissoute	Daphnies	0 – 10 000 µg/L 48 – 96 h (toxicité aigüe) 0 – 100 µg/L 15 jours (toxicité chronique)	BMAA n'est pas létale de façon aiguë sur daphnies (<i>i.e.</i> DL ₅₀ > 10000 µg.L ⁻¹) mais réduction du taux de croissance, biomagnification importante (BCF > 300)	Lurling et al., 2011
BMAA dissoute	Plantes aquatiques	10 – 100 µg/L 1, 3, 7 ou 14 jours	Pas de dégâts physiologiques importants, certaines enzymes anti-oxydantes impactées	Contardo-Jara et al., 2013
i.p.	Rat	300 mg/kg/jour 5 jours consécutifs	Dommages au cervelet (e.g. structurelle, plus d'autophagie, marqueurs de la SLA présents) irréversibles après 3mois	Munoz-Saez et al., 2015

i.p. : injection intrapéritonéale ; i.v. : injection intraveineuse ; BW : body weight ; DL₅₀ : dose létale 50 % ; BCF : bioconcentration factor ; SLA : sclérose latérale amyotrophique

Le groupe de Karlsson a largement contribué aux études réalisées *in vivo* à partir de 2009. En plus de la démonstration du passage transplacentaire et de la barrière hémato-encéphalique de la BMAA, il a rapporté qu'une exposition unique de BMAA à des nouveaux-nés pendant la phase critique de développement du cerveau entraînait des troubles d'apprentissage, mais sur le long-terme (Karlsson et al., 2009b; Karlsson et al., 2011). Ces troubles cognitifs compatibles avec les maladies neurodégénératives ont par la suite été attribués à des changements morphologiques dans le cerveau et des altérations spécifiques d'une zone de l'hippocampe et du striatum (e.g. impacts sur certains neuropeptides impliqués dans le développement et la survie des neurones) (Karlsson et al., 2012; Karlsson et al., 2013; Hanrieder et al., 2014). Les suédois ont également indiqué que le lait maternel murin pourrait être un vecteur de contamination pour les nouveaux-nés (Andersson et al., 2013) suggérant qu'une évaluation de ce risque chez l'homme était rapidement nécessaire.

Peu d'études ont été faites sur les invertébrés terrestres [e.g. (Zhou et al., 2010; Goto et al., 2012)] pourtant le modèle de la drosophile est intéressant et novateur car il permet de relier des anomalies détectées dans la réponse post-synaptique (*i.e.* physiologique) avec des anomalies comportementales (*i.e.* battement d'aile pour la drosophile). Chez ce modèle, la BMAA agit comme un agoniste du glutamate, mais entraîne une ouverture anormalement prolongée des canaux des récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) induisant un influx de Ca^{2+} et une excitotoxicité. Les effets post-synaptiques étaient visibles plusieurs jours avant que la fonction (*i.e.* battement d'ailes) soit affectée et leur sévérité était corrélée à la concentration de BMAA présente dans la synapse. Cependant, les troubles étaient réversibles si l'exposition était stoppée.

Plus récemment, quelques études se sont focalisées sur l'effet de la BMAA sur les organismes aquatiques. Purdie et al. (2009), rapportent que la BMAA ($5 - 50\,000\text{ ng.mL}^{-1}$) cause une gamme d'anomalies neuromusculaires et de développement dans plusieurs étapes de la vie juvénile de *Danio rerio*. L'ajout de carbonate augmentait significativement les effets observés qui sont tous associés à la voie glutamatergique. La BMAA ne serait pas fortement toxique pour *Daphnia magna* selon Lüring et al. (2011) mais en plus d'affecter la durée de vie et la reproduction des adultes, elle engendrerait un stress oxydatif (Esterhuizen-Londt et al., 2015). Des observations similaires ont été faites concernant les défenses oxydatives de certaines plantes aquatiques ainsi que pour deux espèces de moule d'eau douce mais pas pour l'espèce invasive *Dreissena polymorpha* (Esterhuizen-Londt et al., 2011b; Contardo-Jara et al., 2013; Contardo-Jara et al., 2014).

Malgré quelques études ne rapportant aucun effet [e.g. (Cruz-Aguado et al., 2006) et d'autres dans Karamyan and Speth (2008)], quasiment toutes les études toxicologiques *in vivo* sur la BMAA ont donc montré une neurotoxicité avec des troubles fonctionnels et neurodégénératifs en rapport avec un dysfonctionnement moteur, en lien avec la voie glutamatergique. Néanmoins, aucune reproduction exacte des altérations comportementales et neurodégénératives comme celles observées dans le cas de la SLA-PDC n'a été obtenue, excepté Spencer et al chez le primate qui ont été critiqués pour les fortes concentrations utilisées. D'après Karamyan and Speth (2008), en considérant la différence de sensibilité des espèces aux toxines et les différences fonctionnelles dans l'organisation de la structure neuronale, il n'est pas surprenant que les effets observés sur la plupart des modèles animaux ne reproduisent pas exactement les effets de la SLA-PDC chez l'homme ou le primate. Malgré tout, les troubles qui ont été observés sont associés à la fonction motrice suggérant que c'est la cible de la potentielle neurotoxicité de la BMAA. Karamyan and Speth (2008) concluent qu'actuellement, il n'est pas possible de rejeter ou de prouver formellement l'implication de la BMAA dans les maladies neurodégénératives et de nombreuses questions restent en suspens. Notamment, quel modèle animal serait le plus adapté à montrer la neurotoxicité de la BMAA ? existe-t-il des interactions entre la BMAA et d'autres substances exogènes avec une possible synergie toxique ? quel est le mécanisme d'incorporation de la BMAA dans les protéines ? quelles sont les protéines hôtes ? et quel est le devenir de ces protéines ? quels sont les mécanismes moléculaires de la toxicité aiguë et chronique ?

Concernant les isomères de la BMAA, l'administration de DAB engendre des convulsions et des changements neuropathologiques chez le rat [voir références dans Weiss et al. (1989)] alors que l'AEG entraînerait la paralysie voire la mort de *Artemia salina* mais à concentrations élevées (*i.e.* $\geq 10\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Metcalf et al., 2015).

2.5.2. *In vitro*

Le tableau 5 résume certaines études toxicologiques *in vitro*, et précise les modèles, la concentration de BMAA et la durée d'exposition ainsi que les effets observés.

Tableau 5 : exemples d'études toxicologiques *in vitro*. Le modèle cellulaire, les concentrations et la durée d'exposition ainsi que les effets observés sont rapportés. Basé sur Chiu et al. (2011) et complété avec les données récentes.

Modèle	Espèce	Concentration / durée d'exposition	Effets observés	Référence
Neurones corticaux primaires	Souris	3 mM, 1 h avec et sans HCO_3^- (10 – 24 mM)	Activité de la BMAA dépendante de la présence du bicarbonate	Weiss et Choi., 1988
Neurones corticaux primaires	Souris	0,3 – 3 mM, 24 h (+ HCO_3^-)	Activation du récepteur NMDA par BMAA et DAB, potentialisée par bicarbonate	Weiss et al., 1989
Cellules de cerveau	Rat	5 mM en aiguë (+ HCO_3^-)	Excitotoxicité, trouble de l'homéostasie cellulaire (influx Ca^{2+}), dépolérisation	Brownson et al., 2002
Cellules embryonnaires de moelle épinière	Souris	0,03 – 3 mM (+ HCO_3^-) 20 – 24 h	Activation du récepteur AMPA/kainate, dommages sélectifs aux neurones moteurs (30 μM) et stress oxydatif (ROS)	Rao et al., 2006
Culture mixte neurones et astrocytes	Souris	0,1 – 10 mM ; 10 – 100 μM pour co- exposition (+ HCO_3^-) 24 h	Triple mécanisme de toxicité via inhibition antiport Xc^- Potentialisation d'effets neurotoxiques préalables (10 μM)	Lobner et al., 2007 Liu et al., 2009
Lignées cellulaires immortalisées	Homme	0,001 – 10 mM (sans HCO_3^-) 1 à 5 jours	Très faible neurotoxicité par liaison sur récepteurs du glutamate, possible effet sur les mitochondries Rejet de l'hypothèse BMAA	Lee et McGeer., 2012
Neurones primaires isolés	Homme	0 – 1000 μM (avec et sans HCO_3^-) 48 h	Effets excitotoxiques (ROS, dommages à l'ADN, influx Ca^{2+}), sur mitochondries (aussi sans HCO_3^-) et induction de l'apoptose	Chiu et al., 2012
Cellules gliales spécialisées	Rat	0,1 – 3 mM (avec et sans HCO_3^-) 48 h	Effets similaires à Chiu et al., 2012 Gliotoxicité peut indirectement augmenter sensibilité des neurones aux excitotoxines comme BMAA	Chiu et al., 2013
Lignée cellulaire établie SH-SY5Y (neuroblastome) et cellules rénales d'embryon	Homme	0,1 – 5 mM (+ HCO_3^-) 48 h	Association de BMAA aux protéines (incorporation non prouvée), mécanismes excitotoxiques (> mM) et effets sur homéostasie protéiques (< mM) via ROS, stress RE, oxydation et ubiquitination des protéines	Okle et al., 2013
Lignée cellulaire établie SH-SY5Y (neuroblastome)	Homme	3 – 10 mM (+ HCO_3^-) 24 – 48 h	Diminution viabilité, induction de deux marqueurs potentiels de SLA (GSK3 β et TDP-43)	Munoz-Saez et al., 2013
Cellules gliales spécialisées	Rat	250 – 500 μM (+ HCO_3^-) 48 h	Identification de protéines/gènes impactés par BMAA (impliqués dans croissance cellulaire, excitotoxicité, activité mitochondriale, et agrégation protéines) Induction de l'arrêt du cycle cellulaire et apoptose	Chiu et al., 2015

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate ; NMDA : N-méthyl-D-aspartate ; ROS : reactive oxygen species ; RE : réticulum endoplasmique

La première étude *in vitro* a été effectuée par Weiss and Choi (1988) sur des neurones corticaux primaires de souris. Dans cette étude, les auteurs ont remarqué que la toxicité de la BMAA nécessitait la présence d'ions bicarbonate (*i.e.* HCO_3^-), en concentration supérieure ou égale à celle physiologique (≥ 10 mM). En effet, la BMAA associée au bicarbonate forme un adduit β -carbamate (Myers and Nelson, 1990) dont la structure ressemble à celle du glutamate (*i.e.* un neurotransmetteur naturel, à un groupement méthyl près). L'adduit carbamate pourrait donc théoriquement inhiber les récepteurs au glutamate dont le NMDA (Weiss et al., 1989). C'est ce qui est confirmé par la suite avec plusieurs études indiquant que la BMAA, toujours sous forme d'adduit carbamate, serait un agoniste mixte des récepteurs du glutamate [e.g. NMDA, métabotropes et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate)] [voir les références citées dans Chiu et al. (2011)].

L'étude de Brownson et al. (2002) permet de mettre en évidence l'effet toxique qui résulte de l'interaction avec ces récepteurs. En effet, ils observent une augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire sur des cellules de cerveau de rat, ce qui perturbe l'homéostasie cellulaire et peut entraîner la mortalité des neurones. Ce mécanisme, appelé excitotoxicité, est potentiellement impliqué dans les maladies neurodégénératives (figure 6, mécanisme 1) (Chiu et al., 2011).

Trois études importantes entre 2006 et 2009 vont affiner la compréhension des mécanismes toxiques de la BMAA. D'abord Rao et al. (2006) constatent que la BMAA génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) et donc induit un stress oxydatif (figure 6, mécanisme 2). Ensuite Lobner et al. (2007) et Liu et al. (2009) déterminent un triple mécanisme toxique via l'inhibition du système X_c^- (antiport cystine/glutamate). La liaison de l'adduit carbamate aux récepteurs du glutamate (e.g. NMDA et mGluR5) associée à une libération de glutamate, via l'antiport X_c^- , qui se lie à son tour aux mêmes récepteurs (figure 6, mécanisme 3) engendrent tous deux une excitotoxicité (figure 6, mécanisme 1). En parallèle, l'inhibition de la formation de glutathion (figure 6, mécanisme 4) dans les neurones induit un stress oxydatif indirect. Ces trois mécanismes toxiques sont compatibles avec les diverses formes de maladies neurodégénératives connues, alors que les observations de Rao et al. (2006) sont plus particulièrement concordantes avec la perte sélective des neurones moteurs rapportée dans la SLA. De plus, leurs travaux sont les premiers dans lesquels une toxicité de la BMAA est rapportée à de faibles concentrations (*i.e.* 10-30 μM vs. ≥ 1 mM) avec des dommages sélectifs sur les neurones moteurs et par effet synergique des dommages préalables d'autres neurotoxines.

Ces informations sont importantes puisque Lee and McGeer (2012) réfutent l'implication de la BMAA dans les maladies neurodégénératives. En effet, ils observent bien un mécanisme excitotoxique (*i.e.* 200-400 fois plus faible que pour les 6 autres excitotoxines testées), mais à des concentrations qui ne peuvent apparemment pas être ingérées par l'homme. Ils partagent donc les inquiétudes de Duncan et al. (1988 et 1990) sur la pertinence des concentrations utilisées pour les études toxicologiques et sur les sources environnementales qui contiendraient suffisamment de BMAA. Dès lors, il apparaît que le mécanisme excitotoxique de la BMAA est trop faible pour être impliqué dans les maladies neurodégénératives, dont la SLA.

Cependant, les travaux de Chiu vont partiellement contredire les résultats *in vitro* de Lee et McGeer. En effet, ils observent des dommages de la BMAA sur des neurones primaires humains à des concentrations inférieures à 1 μ M, laissant suggérer que les lignées cellulaires immortalisées utilisées par Lee et McGeer sont inadaptées car trop différentes des neurones humains (Chiu et al., 2012). A travers leurs deux études, Chiu et collaborateurs rapportent différents effets caractéristiques de la cascade excitotoxique (e.g. stress oxydatif, perturbation de l'homéostasie cellulaire), qui confirment les études précédentes mais également des dommages aux mitochondries et l'activation de l'apoptose (mécanismes 5 et 6 de toxicité, figure 6). Fait intéressant, la génération de ROS a également été observée pour la BMAA seule, sans la formation d'adduit carbamate et donc sans l'excitotoxicité classique dépendante de la voie glutamatergique (figure 6, mécanisme 7) (Chiu et al., 2012 et 2013). Récemment, ils ont suggéré que la BMAA, en dehors de son mécanisme excitotoxique, pouvait induire un arrêt du cycle cellulaire (figure 6, mécanisme 8) et ainsi l'apoptose des cellules gliales, suite à une exposition de 48 h avec 250 – 500 μ M (Chiu et al., 2015). Cette gliotoxicité de la BMAA pourrait entraîner un dysfonctionnement des cellules gliales et aurait indirectement pour conséquence une augmentation de la vulnérabilité des neurones aux agents excitotoxiques (mécanisme 9 figure 6) comme la BMAA (*i.e.* les cellules gliales compensent les voies métaboliques restreintes des neurones).

Finalement, Okle et al. (2013) confirment que l'excitotoxicité de la BMAA ne serait pas le mécanisme prédominant dans son implication avec les maladies neurodégénératives. Ils ont discriminé les effets cytotoxiques (*i.e.* ≥ 2 mM) communément rapportés de ceux, indépendants, obtenus à des concentrations qu'ils jugent non excitotoxiques et non cytotoxiques (*i.e.* $\leq$ mM). Le dérèglement de l'homéostasie protéique qu'ils observent (e.g. mauvais repliement des protéines, stress du réticulum endoplasmique, mécanisme 10 figure 6) serait un facteur contribuant à l'apparition et/ou la progression

de troubles des neurones moteurs, comme dans la SLA-PDC. Cependant, ce mécanisme nécessite de prouver l'incorporation de la BMAA dans les protéines.

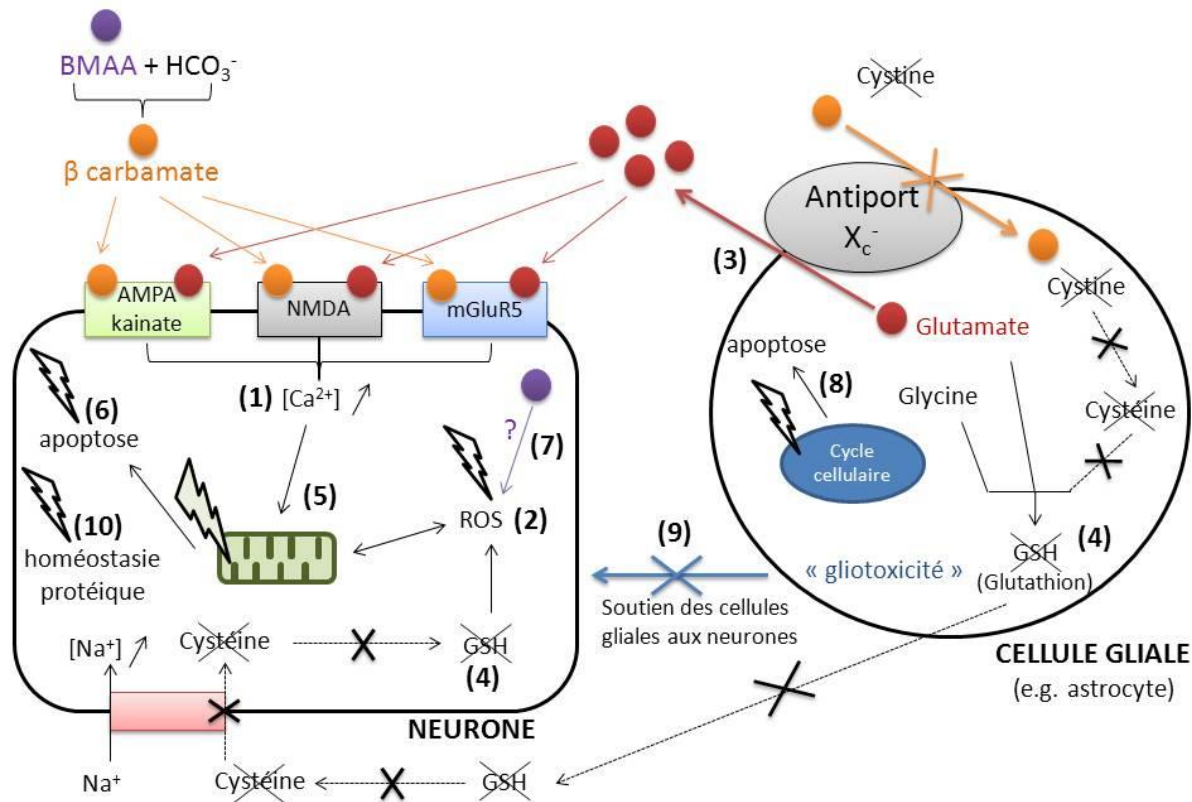


Figure 6 : schéma illustrant quelques mécanismes toxiques rapportés pour la BMAA, *in vitro*. Inspiré de Chiu et al., 2011. La plupart des mécanismes toxiques engendrés nécessitent la présence d'ions HCO_3^- et donc la formation d'un adduit carbamate. Sous cette forme, la BMAA peut se lier aux différents récepteurs du glutamate, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ce qui perturbe l'homéostasie cellulaire (excitotoxicité (1)). Rao et al. (2006) ont ensuite rapporté la présence de ROS dans les neurones moteurs (2) sans doute un effet secondaire de l'entrée d'ions Ca^{2+} via les récepteurs AMPA/kainate. La BMAA inhibe l'antiport cystine-glutamate X_c^- ce qui a deux effets : le relargage de glutamate dans le milieu extracellulaire qui va à son tour se lier aux récepteurs et potentialiser l'excitotoxicité (3) puis l'inhibition de la formation de glutathion qui génère indirectement des ROS (4). L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ainsi que les ROS perturbent l'activité mitochondriale (5) ce qui va induire davantage de ROS et l'apoptose (6). Chiu et al. 2012 observent également la formation de ROS par la BMAA seule (*i.e.* sans adduit carbamate) par un mécanisme inconnu (7). Les mécanismes de toxicité sur les cellules gliales semblent être similaires. Cependant, la BMAA induirait de plus un arrêt du cycle cellulaire à la phase G2/M ce qui engendre l'apoptose des cellules. La gliotoxicité globale augmenterait la susceptibilité des neurones aux excitotoxines comme la BMAA (9). Finalement, l'incorporation de la BMAA dans les protéines pourrait perturber l'homéostasie protéique (10) et participer au développement et à la progression lente des maladies neurodégénératives.

Une seule étude s'est intéressée à la toxicité *in vitro* du DAB. Weiss et al. (1989) rapportent un effet similaire à celui de la BMAA en présence de bicarbonate entraînant une activation du récepteur NMDA. Cependant, des concentrations élevées ont été utilisées (*i.e.* 5 mM). Aucune étude *in vitro* de la toxicité de l'AEG n'a été réalisée.

2.6. Lien BMAA/SLA

2.6.1. Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) aussi appelée maladie de Charcot ou maladie de Lou Gehrig est une maladie chronique du système nerveux central, à évolution progressive. En France il est estimé que le nombre de personnes malades est de 1,5 pour 100 000 habitants, soit environ 1000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année (Orphanet, 2008; Pradat, 2015).

2.6.1.1. Description

Elle est due à l'atteinte des neurones moteurs du cerveau et de la moelle épinière, touchant ainsi la partie du système nerveux responsable du contrôle des muscles squelettiques. La maladie est caractérisée par un affaiblissement puis une paralysie des muscles des jambes et des bras, des muscles respiratoires, ainsi que des muscles de la déglutition et de la parole. Les fonctions intellectuelles et sensorielles ne sont pas touchées (Orphanet, 2008; ALSAssociation, 2015b).

2.6.1.2. Origines

La SLA peut avoir deux origines, l'une familiale et donc liée à un facteur génétique (*i.e.* 5 – 10 % des cas) et l'autre, sporadique, qui pourrait provenir d'une combinaison de facteurs environnementaux, dont la BMAA, et génétiques (Kiernan et al., 2011; Bradley et al., 2013; Torbick et al., 2014).

2.6.1.3. Formes et symptômes

Il existe deux formes de SLA, la forme « spinale » qui représente 2/3 des cas et surtout présente chez les hommes et la forme « bulbaire » qui touche en priorité les femmes. La forme « spinale » débute par l'atteinte d'un membre tandis que la forme « bulbaire » se caractérise en premier lieu par une atteinte des muscles de la bouche. La maladie évoluant dans la majorité des cas par les deux formes simultanées (Orphanet, 2008; ALSAssociation, 2015b).

Les symptômes de la forme spinale débutent majoritairement par une sensation de faiblesse dans un membre, associé à des crampes, des contractures douloureuses et une sensation de raideur. Les premiers signes sont des difficultés de coordination, un manque de précision dans les mouvements ou une perte d'équilibre. Les symptômes s'accroissent jusqu'à ce que tous les membres soient atteints (Orphanet, 2008; ALSAssociation, 2015b).

En ce qui concerne la forme bulbaire, les premiers symptômes sont des difficultés à articuler ou des problèmes de prononciation et un changement dans la voix. Le malade a du mal à mâcher et à déglutir ainsi que plus largement à bouger les muscles du visage. L'aggravation progressive de la maladie entraîne des difficultés à respirer et une fatigue importante ainsi qu'un amaigrissement.

Dans tous les cas la SLA entraîne progressivement un handicap moteur du malade. Il est impossible de prévoir la durée d'évolution de la maladie mais l'espérance de vie d'une personne atteinte de la SLA est d'environ 3 à 5 ans après le diagnostic, sachant qu'elle se déclare généralement entre 50 et 70 ans. Les causes du décès sont le plus souvent dues à des difficultés respiratoires (*i.e.* paralysie des muscles respiratoires et infections) (Orphanet, 2008; ALSAssociation, 2015b).

2.6.1.4. Diagnostic et traitement

Il n'existe pas de dépistage et le diagnostic de la maladie est difficile car les premiers symptômes sont discrets. Il repose sur l'expertise du neurologue mais des tests sont réalisés pour aider à établir le diagnostic :

- Un électromyogramme pour évaluer la fonctionnalité des muscles. Si les muscles fonctionnent mais que les nerfs sont affaiblis la SLA est suspectée car les neurones moteurs sont mis en cause
- Un scanner ou IRM pour éliminer les hypothèses de symptômes dus à des blessures ou anomalies de la moelle épinière
- Une ponction lombaire peut être réalisée afin d'orienter le diagnostic, cependant pour la SLA les résultats doivent être normaux (permet de confirmer la maladie en écartant d'autres hypothèses).

La SLA ne dispose pas de traitement cependant la prise en charge améliore la longévité des patients. Le médicament Riluzole permet de ralentir l'évolution de la maladie alors que la plupart des traitements sont symptomatiques. Des séances de kinésithérapie et d'orthophonie permettent également d'entretenir les fonctions musculaires touchées (Orphanet, 2008; ALSAssociation, 2015b).

2.6.1.5. Ice bucket challenge

La maladie est revenue sur le devant de la scène en 2014 avec le "Ice bucket challenge", le but étant de se filmer en se versant un seau d'eau gelée sur la tête et de nommer une personne pour qu'elle réalise le même challenge dans les 24 heures ou qu'elle offre de l'argent à une association luttant contre la maladie. De cette façon en 2014, l'association américaine ALS a récolté 100 millions de dollars en 30

jours. Cette opération a permis à un large public de connaître la maladie, le challenge ayant été relayé par de nombreuses célébrités et personnalités politiques (ALSAssociation, 2015a).

2.6.2. Historique du lien BMAA-SLA

2.6.2.1. Sur l'île de Guam

La BMAA a été découverte en 1967 sur l'île de Guam, océan Pacifique, en liaison avec la recherche de facteurs environnementaux qui pourraient expliquer la forte incidence anormale (*i.e.* 100 fois supérieure à la moyenne internationale, impliquée dans 8 à 10 % des décès sur l'île) d'une forme particulière de maladie neurodégénérative sur cette île, où les habitants avaient un style de vie très traditionnel avant l'américanisation survenue après la seconde guerre mondiale (Banack et al., 2010a). Après l'observation de l'ensemble des manifestations cliniques, cette maladie a été définie comme SLA-PDC [sclérose latérale amyotrophique/Parkinsonisme-démence complexe (Reed et al., 1966)]. Des données épidémiologiques avaient suggéré qu'une toxine environnementale pourrait en être à l'origine (Garruto et al., 1980). C'est donc vers l'alimentation que les recherches se sont tournées, et notamment vers celle des familles les plus conservatrices qui semblaient davantage concernées (Kurland and Mulder, 1954). Ainsi, les Chamorros consomment de grandes quantités de farine faite à partir des graines de cycas (Whiting, 1963b), une plante endémique de l'île, et c'est dans ces graines que la BMAA a été découverte (Vega and Bell, 1967). Les études *in vivo* qui ont suivi confirment une neurotoxicité de la BMAA mais les concentrations utilisées dépassaient largement celles auxquelles les Chamorros pouvaient être exposés (Duncan et al., 1988).

Les travaux de l'équipe de Paul Alan Cox vont relancer les débats au début des années 2000. Tout d'abord, Cox et al. vont rapporter la bioaccumulation de BMAA dans différents niveaux trophiques de l'écosystème de Guam (Cox et al., 2003) et suggérer d'autres sources potentielles de contamination pour les Chamorros (Banack et al., 2006). Ensuite, ils constatent que la BMAA serait présente sous deux formes dans les organismes, sous forme libre qui était jusqu'alors uniquement considérée mais également sous forme « liée » (Murch et al., 2004a). En effet, une hydrolyse acide (*i.e.* dégradation des protéines en acides aminés) libère de grandes quantités de BMAA, dans toutes les matrices testées (d'un facteur 10 à 240) (figure 7). Ces observations, en plus de la détection de BMAA dans le cerveau de Chamorros décédés de la SLA-PDC (Murch et al., 2004b) convainquent le groupe de Cox de l'implication de la BMAA dans l'étiologie de la maladie, via l'hypothèse suivante.

La BMAA serait biomagnifiée⁴, exposant les consommateurs à de fortes concentrations, notamment via l'ingestion de chauves-souris, un met particulièrement apprécié des Chamorros. Chez l'homme, il existerait un « réservoir neurotoxique endogène » de BMAA associée aux protéines dans le cerveau. Le catabolisme protéique entraînerait une libération lente et progressive de BMAA libre directement dans le cerveau. Cette exposition chronique générerait ainsi les dommages neurologiques (figure 7). Ce mécanisme permettrait également d'expliquer la longue phase de latence observée avant le développement des premiers symptômes de la maladie [*i.e.* jusqu'à trois décennies (Garruto et al., 1980)]. Il fournit aussi une hypothèse du mécanisme de bioaccumulation de la BMAA (*i.e.* incorporation dans les protéines).

Finalement, Cox et collaborateurs s'appuient sur le déclin de l'incidence de SLA-PDC à Guam, qui serait corrélée en partie à l'extermination des chauves-souris (*i.e.* sur-consommation) et aux changements des habitudes alimentaires des Chamorros (Plato et al., 2003), pour confirmer leurs théories et l'implication des chauves-souris dans la SLA-PDC, au moins sur l'île de Guam (Banack et al., 2010a; Banack et al., 2015).

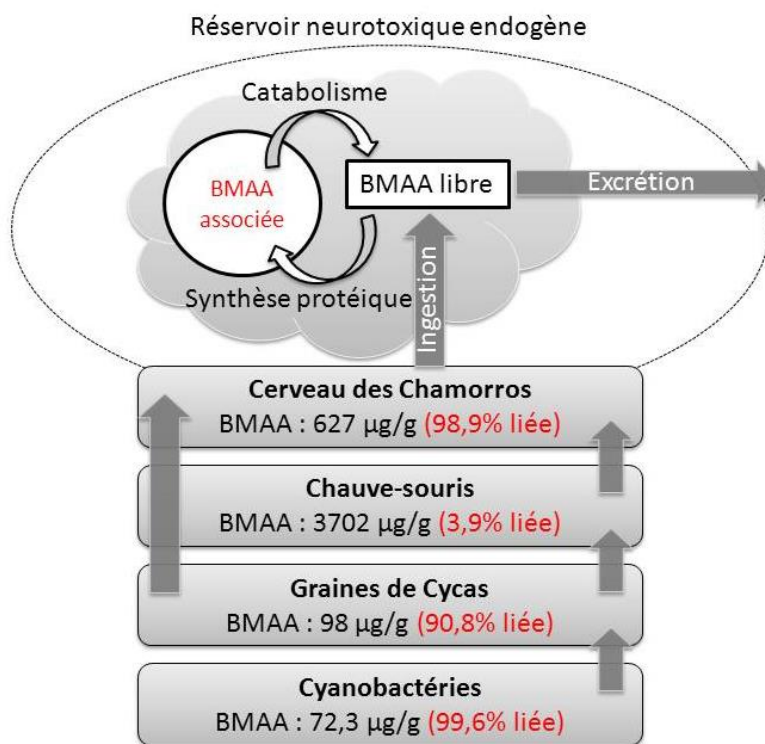


Figure 7 : biomagnification de la BMAA dans l'écosystème de Guam, sous forme libre et liée, et schéma du réservoir neurotoxique endogène (e.g. comme supposé dans le cerveau des Chamorros). Modifié à partir de Murch et al. (2004a).

⁴ Accumulation croissante à chaque niveau trophique supérieur

2.6.2.2. En dehors de l'île de Guam

Les travaux de ce groupe américain ont également soulevé le risque d'une accumulation de BMAA en dehors de l'écosystème de Guam et donc l'implication de la neurotoxine dans l'étiologie de maladies neurodégénératives d'une façon plus généralisée.

En effet, le fait que la BMAA ait été retrouvée dans une cyanobactérie endosymbiotique des cycas à Guam (Cox et al., 2003) puis dans 95 % des souches qu'ils ont criblées, en utilisant néanmoins une méthode d'analyse non sélective (Cox et al., 2005), laisse suggérer une bioaccumulation potentielle dans la plupart des écosystèmes aquatiques (*i.e.* les cyanobactéries sont des organismes ubiquitaires à la base des chaînes alimentaires). Ils s'appuient aussi sur la détection majeure de BMAA dans le cerveau de patients Canadiens décédés de maladies neurodégénératives (*i.e.* SLA et Alzheimer, ≤ 270 vs. ≤ 1200 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW pour les Chamorros) (Murch et al., 2004b; Pablo et al., 2009). A l'inverse, ceux décédés de la maladie de Huntington, connue pour être héréditaire, et les témoins négatifs ne contenaient pas ou très peu de BMAA (*i.e.* ≤ 45 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW). Il est important de préciser que l'étude de Pablo et al. est indépendante. En effet, différents rapports contredisent les hypothèses de Cox et collaborateurs, en raison de la non-confirmation de la présence de BMAA dans le cerveau (Montine et al., 2005; Snyder et al., 2010; Combes et al., 2014). Ces autres équipes ont néanmoins utilisé des méthodes de préparation d'échantillon et d'analyse différentes (elles ont notamment considéré seulement la forme libre de BMAA pour deux d'entre elles).

Malgré ces rapports contradictoires, Bradley and Mash (2009) considèrent que l'hypothèse de l'implication de la BMAA dans les maladies neurodégénératives est convaincante et que le risque provenant de la production de BMAA par les cyanobactéries est réel, notamment en dehors de l'île de Guam, surtout pour des personnes qui présenteraient une susceptibilité génétique.

Depuis, une bioaccumulation de BMAA a été rapportée dans différents écosystèmes comme en Floride (Brand et al., 2010), en mer Baltique (Jonasson et al., 2010) ou dans le lac Taihu en Chine (Jiao et al., 2014), confirmant l'hypothèse de Cox et al. sur une exposition généralisée à la BMAA. Notamment, d'autres études suggèrent un possible lien (en admettant qu'il n'est pas prouvable) entre la consommation d'aliments contenant de la BMAA et l'existence de clusters de SLA (Field et al., 2013; Masseret et al., 2013; Banack et al., 2014).

La récente étude de Berntzon et al. (2015) va cependant alimenter la controverse puisqu'ils ne retrouvent de la BMAA que dans 3 (dont 2 témoins) des 25 liquides céphalo-rachidiens de patients

suédois décédés (*i.e.* 13 témoins en tout). Leurs résultats, obtenus avec une méthode très sélective (*i.e.* CL-SM/SM et étalon interne), suggèrent que la BMAA est peu retrouvée et pas préférentiellement dans le liquide céphalo-rachidien de personnes atteintes de SLA.

Aussi, le lien entre la BMAA et les maladies neurodégénératives comme la SLA reste controversé. Il repose sur la possible incorporation de BMAA dans les protéines qui, elle aussi, n'a pas clairement été prouvée à ce jour.

Une étude épidémiologique récente en Nouvelle-Angleterre affirme que le risque de développer la SLA est plus grand pour des personnes vivant près de lac dont la qualité de l'eau est médiocre et pouvant contenir des blooms de cyanobactéries (selon des paramètres comme la quantité de chlorophylle a, méthode du disque de Secchi, quantité d'azote totale) (Torbick et al., 2014).

En France, le programme BMAALS, regroupant notamment les membres du « réseau de méthodologie coordonnée d'investigation des agrégats spatio-temporels de SLA » est un projet multidisciplinaire ambitieux chargé d'étudier le lien entre la BMAA et la SLA (Delzor et al., 2014).

2.7. Incorporation de la BMAA dans les protéines ?

Plusieurs études ont rapporté la présence de BMAA dans le cerveau/liquide céphalo-rachidien de souris ou de singes (Kisby et al., 1988; Karlsson et al., 2009a; Xie et al., 2013) mais aussi d'humains (Murch et al., 2004b; Pablo et al., 2009) suggérant que la BMAA est capable de passer la barrière hémato-encéphalique, via le transporteur des acides aminés neutres notamment (Duncan et al., 1991).

La libération de BMAA suite à une hydrolyse acide laisse supposer qu'elle est capable de se lier aux protéines (Murch et al., 2004a). Les études *in vivo* de Karlsson et al. (2009a) et Xie et al. (2013) vont dans ce sens, puisque la distribution de BMAA dans le cerveau de souris et sa cinétique d'accumulation semblent être explicables par l'incorporation de la BMAA dans les protéines. Dans une autre étude, Karlsson et al. (2014) ajoutent que cette incorporation était plus importante dans les organes présentant un fort taux de turnover/synthèse protéique, comme le foie.

Les travaux *in vitro* de Dunlop et al. (2013) identifient finalement un mécanisme d'incorporation. La ^3H -BMAA serait incorporée à la place de la L-sérine via une compétitivité entre ces deux acides aminés et une erreur de chargement de l'ARNt⁵. Ce type d'erreur de traduction a déjà été rapporté pour d'autres acides aminés non protéiques dits « protéomimétiques » (e.g. L-DOPA) (Rodgers, 2014). De plus,

⁵ nucléotides qui interviennent lors de la synthèse des protéines en apportant les acides aminés aux ribosomes

l'incorporation de BMAA aux protéines engendre une déstabilisation de leur structure et un mauvais repliement menant à la formation d'agrégats (Dunlop et al., 2013), des marqueurs des maladies neurodégénératives qui supportent les observations de Okle et al. (2013). Néanmoins ce dernier groupe considère que bien que leurs résultats aient montré une association avec les protéines, l'incorporation reste à prouver.

Le mécanisme d'incorporation de la BMAA dans les protéines par une erreur de synthèse a été confirmé par Glover et al. (2014) avec un système de synthèse protéique artificiel (*i.e.* PURExpress® protein synthesis kit). Ils précisent que la BMAA peut aussi se substituer à d'autres acides aminés (*e.g.* alanine). De plus, l'association de la BMAA avec les protéines se ferait à la fois via l'incorporation dans les protéines comme rapporté par Dunlop et al (2013) mais également par liaisons covalentes non spécifiques (*i.e.* 50 % de la BMAA « incorporée » est libérée par dénaturation des protéines) ce qui supporte davantage les travaux de Okle et al (2013). Autre information intéressante, Glover et al. (2014) rapportent qu'à l'inverse de la BMAA, la capacité d'incorporation dans les protéines de ses isomères (*i.e.* DAB et AEG) semble beaucoup plus restreinte. Pourtant ces molécules ont déjà été rapportées sous forme associée aux protéines [*e.g.* dans les cyanobactéries par Rosen and Hellenas (2008)].

Les données actuelles *in vitro* et *in vivo* suggèrent donc que de la BMAA libre peut s'associer avec les protéines. Néanmoins, ce mécanisme n'a pas été observé pour des organismes aquatiques d'eau douce (*i.e.* moules et daphnies) ni en présence de BMAA dissoute, ni lorsque les daphnies étaient exposées à des cyanobactéries contenant de la BMAA associée aux protéines (Downing et al., 2014; Esterhuizen-Londt et al., 2015). Cependant, Baptista et al. (2015) ont observé une accumulation de BMAA (sous forme totale) pour des moules marines nourries avec une cyanobactérie contenant des traces de BMAA.

Ces résultats conflictuels, en plus du rapport de van Onselen et al. (2015) concernant l'association « superficielle » de la BMAA avec la surface des protéines chez les bactéries (*i.e.* et non son incorporation) suscitent des questionnements. L'association de la BMAA avec les protéines et/ou l'incorporation pourraient être plus complexes que suggérées actuellement.

L'association covalente non spécifique/l'incorporation dans les protéines de la BMAA est fondamentale et doit être indiscutablement prouvée. En effet, elle supporte l'implication de la BMAA dans certaines maladies neurodégénératives (*i.e.* « réservoir neurotoxique » et mauvais repliement des protéines à l'origine d'une intoxication chronique pour l'homme). De plus, l'incorporation dans les

protéines est aussi indirectement importante puisqu'elle permettrait d'expliquer la bioaccumulation de BMAA dans des organismes de niveaux trophiques supérieurs, dont ceux sont consommés par l'homme.

2.8. Analyse de la BMAA et ses isomères

2.8.1. Méthodes physico-chimiques

La BMAA et ses isomères sont des acides aminés non protéiques mais qui peuvent potentiellement s'associer aux protéines (*cf.* paragraphe 2.7). Ce sont donc des petites molécules polaires (*i.e.* 118,1 Da) qui sont présentes à l'état de trace, dans des cyanobactéries mais aussi dans des matrices plus complexes. Il faut utiliser des méthodes très sensibles et sélectives pour obtenir une identification formelle et une quantification la plus exacte possible. De l'extraction à l'analyse, chaque étape nécessite d'être optimisée (figure 8).

L'analyse de la BMAA est un challenge et à l'origine de nombreuses controverses, comme évoqué par Duncan (2012) *"the role of BMAA in neurodegenerative disorders is fiercely debated. In large part, the controversy arises because of conflicting findings relating to the analytical work underpinning this complex web of observation and chemical analysis"*.

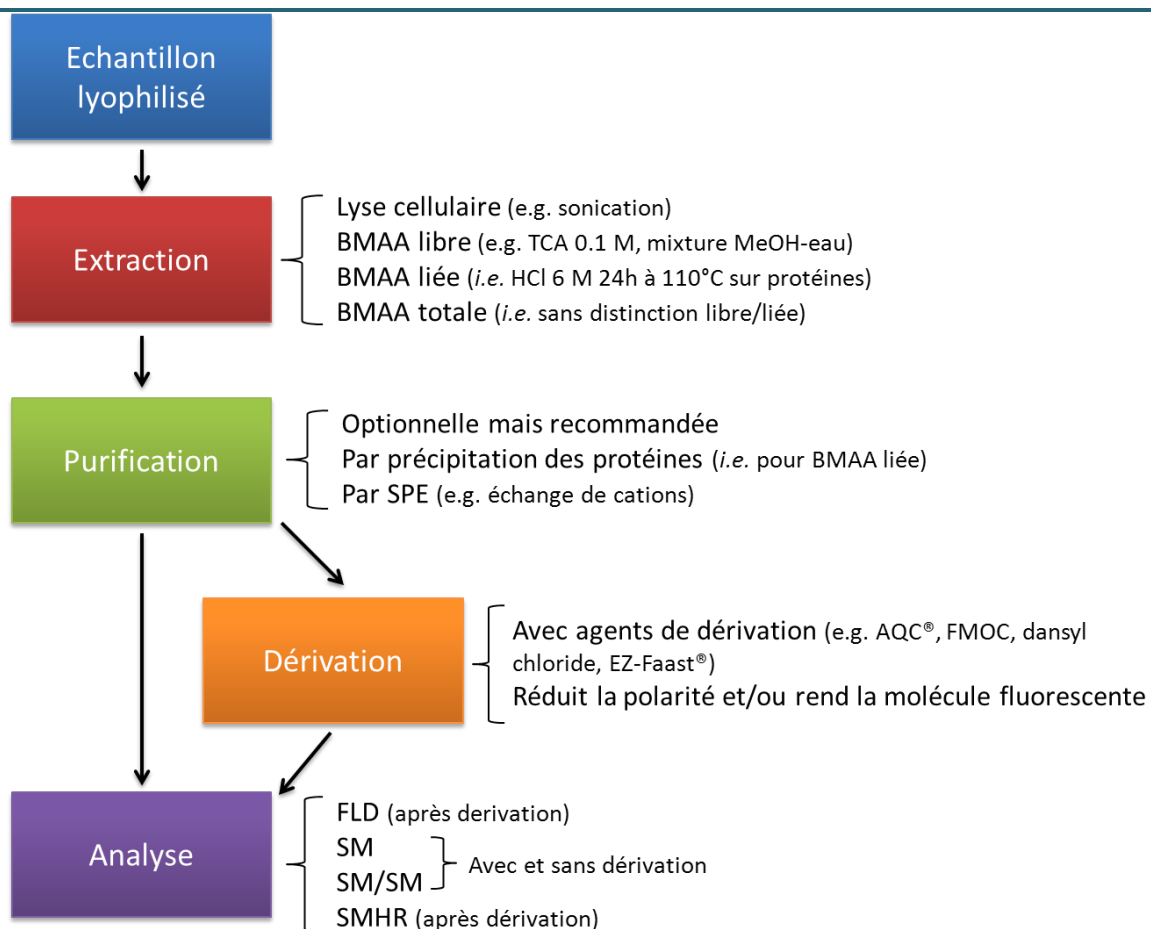


Figure 8 : schéma globale de l'analyse de la BMAA et ses isomères. TCA : acide trichloroacétique ; FMOC : 9-fluorenylmethylchloroformate.

2.8.1.1. Extraction

La BMAA existe sous deux formes, en tant qu'acide aminé libre mais également associée aux protéines, bien que la nature exacte de cette association ne soit pas encore élucidée (Glover et al., 2014). La BMAA et ses isomères ont été retrouvés dans différentes microalgues mais également dans d'autres matrices (e.g. organismes aquatiques, plantes, cerveaux humains) (*cf.* paragraphe 2.9.2). Ces acides aminés sont extraits sous forme libre, liée ou totale (figure 8). Indépendamment de sa forme, l'extraction nécessite la lyse des cellules dans un solvant adapté. Pour la recherche de la forme libre, l'acide trichloroacétique (TCA) à 0,1 M est majoritairement utilisé (Cox et al., 2003). La BMAA associée aux protéines n'est pas quantifiable sous cette forme. Cependant, une hydrolyse acide qui dégrade les protéines en acides aminés (*i.e.* HCl 6 M, classiquement 24 h à 110°C) libère la BMAA qui est ensuite dosée (Murch et al., 2004a). En effet, une rupture des liaisons peptidiques semble nécessaire pour libérer la BMAA associée aux protéines (Dunlop et al., 2013). L'hydrolyse enzymatique (e.g. trypsine,

pronase) est également possible mais les rendements obtenus sont plus faibles [*i.e.* < 33 % d'après Baptista et al. (2015)]. La proportion de BMAA liée peut être 10 à 240 fois plus importante que la forme liée (Murch et al., 2004a).

2.8.1.2. Etape de purification/concentration

Initialement, la BMAA libre était dissociée de la BMAA liée par l'intermédiaire d'une précipitation des protéines (*i.e.* la BMAA libre dans le surnageant et la BMAA liée dans le culot protéique) d'où l'utilisation d'acide trichloroacétique (Cohen, 2012). Cette technique de préparation d'échantillon peut également être considérée comme une étape de purification (Chambers et al., 2007). Certains groupes ont d'ailleurs récemment privilégié cette méthode pour l'analyse de la BMAA liée aux protéines de diatomées et dinoflagellés marins (Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014).

Mais, la procédure la plus employée pour purifier les échantillons est la purification par SPE (solid phase extraction). Elle consiste en la séparation d'un ou plusieurs analytes par une partition sélective entre une phase solide (adsorbant) et une phase liquide (solvant) (figure 9). Les adsorbants contenus dans les cartouches doivent être conditionnés (souvent par du méthanol puis avec le solvant contenant l'échantillon). Ensuite les échantillons sont déposés. Il est possible d'effectuer une étape de lavage pour supprimer sélectivement certains composants de la matrice et la rendre moins complexe (*i.e.* réduction théorique des effets matrices). Enfin, les molécules d'intérêt sont éluées et récupérées avant l'analyse. C'est la nature de l'adsorbant (e.g. phase inverse, échange cationique) et ses mécanismes de rétention qui vont déterminer les types de solvants à utiliser pour chaque étape.

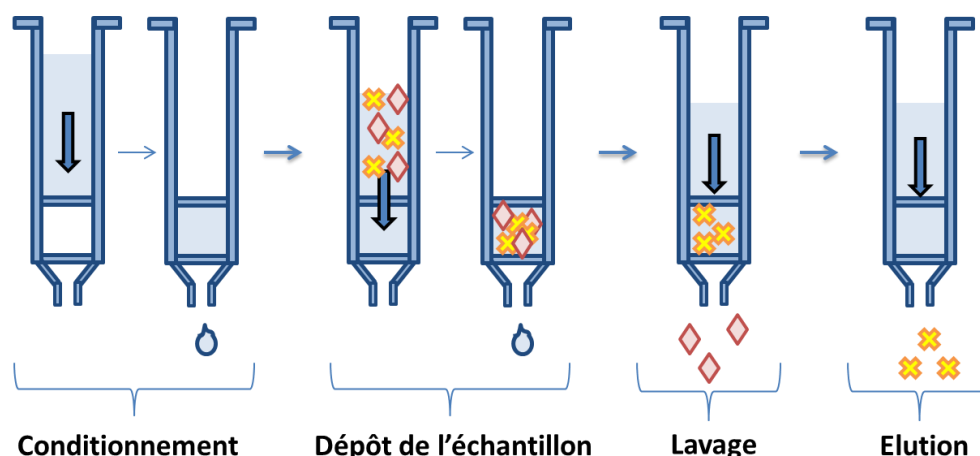


Figure 9 : principe et étapes de la SPE. Les croix jaunes représentent les molécules d'intérêt.

Plusieurs adsorbants ont été utilisés, notamment des phases mixtes avec échanges cationiques (e.g. Oasis® MCX, Isolute HXC-3, Strata™-X-C) en raison de la structure de la BMAA et ses isomères (*i.e.* acides aminés basiques polaires) (Kubo et al., 2008; Spáčil et al., 2010; Roy-Lachapelle et al., 2015). La procédure de purification et les principes par échanges de cations sont résumés en annexe 10.

L'avantage de la purification par adsorbants mixtes est sa grande sélectivité (*i.e.* seules sont retenues les molécules chargées positivement au pH utilisé) ainsi que la possibilité de réduire les effets matrices par différents lavages (e.g. avec un solvant organique). Cette procédure est donc recommandée, surtout lors de l'utilisation de méthode HILIC-SM/SM (Cohen, 2012). Cependant, les rendements d'extraction sont généralement plus faibles que lors de l'utilisation de phases moins sélectives et dépendent des matrices (tableau 6). Ils doivent donc être évalués et pris en compte lors de la quantification des échantillons.

Tableau 6 : rendements SPE et effets matrices restant pour l'analyse de la BMAA à partir de différentes matrices.

Matrices	Adsorbant	Rendements sur standards (%)	Rendements dans matrices (%)	Effets matrices après SPE (%)	Référence
Cyanobactérie	Oasis® MCX Oasis® HLB Sep-pak C18	-	80 – 90 Non retenue Non retenue	-	Kubo et al., 2008
Eau du robinet Eau salée Eau avec acides aminés	Strata™-X-C	78 – 103	61 63 57	-	Esterhuizen-Londt and Downing, 2011
Cyanobactérie	Oasis® MCX Strata™-X-C	69 – 72 82 – 91	70 – 89	≤ – 34	Li et al., 2012
Eau de rivière, cyanobactérie, biofilms	Oasis® MCX	88 87	74 – 75 70 – 72 66 – 67	– 30 – 41 – 37	Combes et al., 2013
Cyanobactérie	Isolute® HXC-3	-	63*	+ 18	Jiang et al., 2013
Cerveau et muscle de poisson	Isolute® HXC-3	-	34 – 55** 11 – 14**	NQ	Lage et al., 2015a
Eaux avec des cyanobactéries	Strata™-X-C	97 – 102 95 – 99 93 – 102	85 – 90 78 – 82 85 – 90	-	Roy-Lachapelle et al., 2015

* rendement total ; ** rendements SPE et dérivation ; NQ : un effet matrice a été observé mais pas quantifié ; en rouge les rendements pour la BMAA, en bleu pour le DAB et en noir pour l'AEG ; remarque : un effet matrice négatif signifie une diminution de signal et vice-versa.

2.8.1.3. Analyse en chromatographie liquide

Des dizaines de méthodes d'analyse de la BMAA ont été rapportées (Glover and Murch, 2014). Les premières dérivent des méthodes classiquement utilisées pour l'analyse des acides aminés (*i.e.* dérivation et détection par fluorescence, FLD). Mais la complexité d'analyse a rendu l'emploi de méthodes plus sélectives nécessaire (*i.e.* SM/SM), notamment en raison de l'existence d'au moins trois isomères naturels : le DAB, l'AEG et la BAMA. Cependant, malgré l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM), des méthodes ultra sélectives ont été rapportées seulement à partir de 2012 (*i.e.* prise en compte de fragments sélectifs et des ratios d'ions), laissant le doute sur la nature des molécules identifiées en tant que BMAA auparavant.

Méthodes avec dérivation

Les méthodes employant la dérivation des molécules d'intérêt proviennent de l'analyse des acides aminés. De nombreux agents de dérivation ont été utilisés pour la BMAA et ses isomères, *i.e.* le kit de Waters AccQ-Tag, le kit de Phenomenex EZfaast™, le FMOC (9-fluorenylmethyl chloroformate), le DNS (dansyl chloride) et dernièrement le C₄-NA-NHS (N-hydroxysuccinimide ester of N-butylnicotinic acid) (tableau 7).

Tableau 7 : principaux agents de dérivation utilisés dans l'analyse de la BMAA, ions moléculaires et fragments obtenus pour l'analyse par spectrométrie de masse. Les ions obtenus sans dérivation ont aussi été rapportés, pour comparaison.

Agent de dérivation	Principe (état de dérivation)	Ion moléculaire [M+H] ⁺ > fils (<i>m/z</i>)	Système analytique	Références
AQC	Réagit avec les amines (simple < double dérivation)	459 > 171, 289, 119, <u>258</u> , <u>214</u> , <u>188</u>	LC-FLD LC-SM et SM/SM	Murch et al., 2004a; Banack et al., 2007; Jiang et al., 2012
EZfaast™	Réagit avec les amines et carboxyles (triple dérivation)	333 > 273, 245	GC-SM LC-SM et SM/SM	Esterhuizen and Downing, 2008; Esterhuizen-Londt et al., 2011a
FMOC	Réagit avec les amines (simple et double dérivation)	563	LC-FLD	Kisby et al., 1988; Scott et al., 2009
DNS	Réagit avec les amines (double dérivation)	585 > <u>289</u> , 277, 170, <u>71</u> , 88	LC-SM/SM LC-SMHR	Salomonsson et al., 2013; Roy-Lachapelle et al., 2015
C ₄ -NA-NHS	Réagit avec les amines (simple et double dérivation)	221* > <u>249</u> , <u>217</u> , <u>193</u> , <u>137</u> , 106 280 > <u>149</u> , <u>205</u>	LC-SM/SM	Andrys et al., 2015
Sans	Molécule détectée directement	119 > 102, <u>101</u> , <u>88</u> , <u>76</u> , <u>74</u> , 44	LC-SM/SM	Rosen et Hellenas., 2008

Les ions soulignés sont spécifique de la BMAA ou de ses isomères (DAB et AEG); la dérivation par FMOC a seulement été utilisée pour une analyse en FLD donc les ions produits ne sont pas disponibles, * correspond à l'ion doublement chargé

Les molécules obtenues après dérivation sont rapportées en annexe 11 pour les dérivés FMOC, propylchloroformate et AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate). La réaction avec ces agents de dérivation rend les acides aminés moins polaires, permet donc leur rétention sur les colonnes chromatographiques en phase inverse et améliore également la sensibilité et la sélectivité de l'analyse (Banack et al., 2011; Cohen, 2012). L'avantage des agents AQC et EZfaastTM est qu'ils sont commercialisés en kit, donc plus robustes et reproductibles. C'est d'ailleurs la dérivation par AQC qui a le plus été utilisée dans l'analyse de la BMAA (Cox et al., 2003; Murch et al., 2004a; Cox et al., 2005; Metcalf et al., 2008; Brand et al., 2010; Jonasson et al., 2010; Jiang et al., 2014a; McCarron et al., 2014; Mondo et al., 2014; Berntzon et al., 2015). D'autres groupes estiment néanmoins qu'ils ont obtenu une meilleure sélectivité et /ou sensibilité en utilisant d'autres agents de dérivation (Salomonsson et al., 2013; Andrys et al., 2015).

Une des contraintes de la dérivation est que les rendements doivent être optimisés, alors qu'ils le sont rarement (Cohen, 2012). 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. Ainsi, Kruger et al. (2012) estiment que plus de 100 composés isobariques peuvent interférer avec la dérivation. Il faut donc que l'agent soit en quantité suffisante pour réagir avec tous les acides aminés, incluant la BMAA et ses isomères. Un groupe suédois a tenté d'établir la quantité maximale de protéines permettant un rendement optimale de dérivation avec l'agent AQC (Eriksson et al., 2009). Néanmoins, ce groupe n'a pas pris en compte cette valeur dans leurs publications qui ont suivi, sans explication, et leurs résultats ont par la suite été critiqués par d'autres équipes (Cohen, 2012; Faassen, 2014). D'après Cohen (2012), l'état de dérivation de la lysine (*i.e.* suivi de sa forme mono dérivée) pourrait servir d'étalon interne pour estimer le rendement de dérivation de la BMAA et ses isomères.

Aujourd'hui, la dérivation demeure une méthode importante pour l'analyse de la BMAA et ses isomères par spectrométrie de masse, mais sa sélectivité doit être optimale (*i.e.* utilisation d'ions produits caractéristiques par CL-SM/SM). Récemment, une équipe a même utilisé la dérivation par DNS pour faire de la spectrométrie de masse haute résolution sur la BMAA, ses isomères et d'autres cyanotoxines (*i.e.* ATX, CYN et STX) (Roy-Lachapelle et al., 2015).

Tandis que certaines équipes prônent cette procédure (e.g. les équipes américaines, sud-africaines et suédoises), d'autres y sont opposées (les groupes européens notamment) et ont opté pour

des méthodes sans dérivation, nécessitant l'utilisation de colonnes adaptées à la nature polaire de la BMAA, la chromatographie HILIC.

Méthodes sans dérivation

La technologie HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) a fait son apparition à la fin des années 80 (Alpert, 1990). Selon la description faite par Alpert, son mécanisme implique un partage des analytes entre une couche de phase mobile enrichie en eau partiellement immobilisée à la surface de la phase stationnaire et une phase mobile plus hydrophobe. Son principe correspond donc à une chromatographie en phase normale (*i.e.* phase stationnaire polaire) en utilisant un mélange de phases mobiles comprenant une grande proportion de solvant organique (e.g. $\geq 50\%$ d'acétonitrile) (Alpert, 1990). Ainsi l'ionisation des molécules est favorisée dans la source du spectromètre de masse en comparaison des phases mobiles fortement aqueuses utilisées en chromatographie en phase inverse (Jandera, 2011). La chromatographie HILIC constitue une alternative dans la sélectivité des colonnes chromatographiques puisqu'elle permet la rétention des composés polaires.

Cette technologie permet donc la rétention et séparation de la BMAA et ses isomères sans avoir recours à une étape de dérivation. Les molécules sont ainsi directement analysées alors que ce sont leurs dérivés qui le sont autrement. Deux types de colonnes HILIC ont majoritairement été utilisées, la TSKgel Amide-80 (Kubo et al., 2008; Li et al., 2012; Fan et al., 2014; McCarron et al., 2014) et la Zic®-HILIC (Rosen and Hellenas, 2008; Faassen et al., 2012a; Combes et al., 2013; Combes et al., 2014). Elles ont permis d'obtenir des résolutions intéressantes entre la BMAA et ses isomères malgré leurs différences de phases et de mécanismes de rétention (*i.e.* groupements amides greffés sur silice et donc interactions par liaisons hydrogènes vs. groupes fonctionnels zwitterioniques et interactions électrostatiques) (Viklund et al., 2001; Yoshida, 2004; Ikegami et al., 2008; Chirita et al., 2011).

La chromatographie HILIC a été associée à une détection par spectrométrie de masse (Kubo et al., 2008), mais surtout par spectrométrie de masse en tandem. Ainsi, plusieurs ions caractéristiques de la BMAA et du DAB ont été découverts (tableau 7), dont certains spécifiques (e.g. 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). A l'inverse, aucun ion caractéristique n'a été rapporté pour l'AEG.

L'association de colonnes HILIC avec la spectrométrie de masse en tandem peut donc s'appliquer à l'analyse de la BMAA et ses isomères sans dérivation, permettant malgré tout une grande sélectivité

ainsi qu'une bonne sensibilité. Ces méthodes sont cependant à l'origine de la controverse analytique entourant la détection de la BMAA puisqu'elles n'ont pas obtenu les mêmes résultats que les méthodes avec dérivation à la même époque (cf. paragraphe 2.8.2).

2.8.2. Controverse analytique et conséquences

Malgré des décennies de recherche associées à la BMAA, de nombreuses controverses ont tour à tour stimulé ou freiné les études portant sur la toxicité, la production par les cyanobactéries et la présence dans l'environnement. Une des principales controverses est celle entourant la détection de la BMAA. En effet, en tant que petite molécule polaire, son analyse n'est pas simple surtout que plusieurs isomères naturels ont été identifiés, parfois au sein d'un même échantillon. Ainsi, plusieurs groupes s'opposent dans le choix des méthodes à utiliser (*i.e.* dérivation vs. sans dérivation), ce qui a donné lieu à des débats à travers plusieurs publications (Banack et al., 2010b; Krüger et al., 2010; Kruger et al., 2012; Faassen, 2014).

Un premier constat que l'on peut faire c'est qu'il y a un facteur 1 million entre les concentrations les plus faibles et les plus fortes qui ont été rapportées pour la BMAA. Il y a de plus, une sorte de bimodalité quant à l'absence/présence de BMAA dans les cyanobactéries, en fonction de la méthode analytique [*i.e.* certaines méthodes en FLD rapportent systématiquement de la BMAA alors que d'autres comme la HILIC-SM/SM non (tableau 8)]. Bien que plusieurs hypothèses concernant une variabilité biologique ou environnementale aient été suggérées, il est plus probable que cet énorme facteur soit le résultat de l'utilisation de méthodes non sélectives (Jiang et al., 2013; Faassen, 2014; Jiang et al., 2014a).

En effet, de nombreuses études ont utilisé la CL-FLD après dérivation des molécules. Pourtant cette technique d'analyse de la BMAA manque de sélectivité et produit des faux-positifs (Faassen et al., 2012a). Par conséquent, certains groupes ont fait part de leurs inquiétudes concernant la nature des molécules qui ont été identifiées par FLD (Kruger et al., 2012; Faassen, 2014). Même si tout le monde s'accorde sur le fait que la FLD ne doit plus être utilisée pour l'analyse de la BMAA et ses isomères, les débats ne sont pas clos quant à la méthode la plus appropriée. Tandis que certains défendent la dérivation et ses avantages, d'autres critiquent ses inconvénients en proposant une alternative (*i.e.* la chromatographie HILIC) et vice-versa (tableau 8).

Tableau 8 : sélectivité, performances, avantages et inconvénients des trois principales méthodes d'analyse de la BMAA.

Critères	Dérivation – FLD ou dérivation – SM	Dérivation – SM/SM	Sans dérivation – SM/SM
Sélectivité et critères d'identification	1 ou 2 critères RT et ion moléculaire	Jusqu'à 4 critères RT, ion moléculaire, ions fils, ratios d'ions	Jusqu'à 4 critères RT, ion moléculaire, ions fils, ratios d'ions
Sensibilité ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	$\geq 0,7$ ⁶	$\geq 0,1$ ⁸	$\geq 0,6$ ¹⁹
Concentrations rapportées dans microalgues ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) et échantillons positifs	10 – 6721 (95%, n=30) ¹ 8 – 287 (100%, n=12) ² 0,1 – 2757 (96%, n=27) ³ 0,05 – 10,7 (95%, n=20) ⁴ 0,04 – 63 (100%, n=18) ⁵ 7,1 – 56 (50%, n=8) ⁶	0,001 – 0,015 (100%, n=21) ⁷ N.d (n=8) ⁶ 0,73 (100%, n=1) ⁸ 0,001 – 0,004 (100%, n=8) ⁹ 2 – 7,1 (100%, n=10) ¹⁰ 0,46 (100%, n=1) ¹¹	N.d (n=36) ¹² 4 – 41 (42%, n=21) ¹³ N.d (n=30) ¹⁴ N.d (n=8) ⁶ N.d (n=10) ¹⁵
Avantages rapportés ^{6, 8, 12,14, 16, 17}	- Analyse des acides aminés	- Très sensible et sélective - Bonne séparation chromatographique - Meilleure ionisation - hors du bruit de fond	- Très sensible et sélective - Excellente séparation chromatographique - Meilleure ionisation - molécules directement détectées
Inconvénients rapportés ^{6, 8, 12,14, 16, 17, 18}	- Manque de sélectivité - Faux-positifs	- Détection des dérivés des molécules - Dérivation non spécifique - Formation de dérivé de BMAA à partir de carbamate ou glucuronide	- La molécule non dérivée est réactive - Mécanismes de rétention partiellement élucidés - Fort effet matrice

RT : Retention time ; N.d : non détecté ; ¹Cox et al., 2005 ; ²Metcalfe et al., 2008 ; ³Esterhuizen et Downing 2008 ; ⁴Esterhuizen-Londt et Downing 2011 ; ⁵Cervantes Cianca et al., 2012 ; ⁶Faassen et al., 2012 ; ⁷Jonasson et al., 2010 ; ⁸Jiang et al., 2013 ; ⁹Jiang et al., 2014 ; ¹⁰Jiao et al., 2014 ; ¹¹Lage et al., 2014 ; ¹²Rosen and Hellenas, 2008 ; ¹³Faassen et al., 2009 ; ¹⁴Krüger et al 2010 ; ¹⁵McCarron et al., 2014 ; ¹⁶Banack et al., 2010 ; ¹⁷Cohen 2012 ; ¹⁸Glover et al., 2012 ; ¹⁹Combes et al., 2013.

Selon Krüger et al. (2010), la résolution chromatographique est plus difficile à atteindre après dérivation, en raison de l'homogénéisation des structures moléculaires. Par exemple, Roy-Lachapelle et al. (2015) observent une co-élution de la BMAA et l'AEG après dérivation avec le DNS. Mais la BMAA dérivée est théoriquement mieux ionisée par électronébulisation (*i.e.* car plus lipophile donc à la surface des gouttes générées par ce mode d'ionisation) et sa masse moléculaire (*i.e.* 458 vs. 118 sans dérivation) réduit le bruit de fond (Banack et al., 2010b). Il est vrai que la méthode la plus sensible rapportée à ce jour comporte une étape de dérivation par AQC (Jiang et al., 2013). Sans dérivation, les molécules sont détectées directement mais elles pourraient interagir avec la matrice en formant des adduits, notamment avec les ions métalliques (Glover et al., 2012).

Comme la BMAA possède de nombreux isomères naturels potentiels (Kruger et al., 2012), dont 3 rapportés dans des échantillons environnementaux (*i.e.* DAB, AEG et BAMA) (Rosen and Hellenas, 2008; Jiang et al., 2013; Masseret et al., 2013), l'emploi de la spectrométrie de masse en tandem est donc à privilégier. La présence de composés interférant, qui possèdent un temps de rétention très proche de celui de la BMAA, a également été rapportée dans des échantillons biologiques (Jiang et al., 2012) et pourrait générer de faux-positifs ou des surestimations de concentrations si les critères de sélectivité ne sont pas optimisés. L'emploi de méthodes non sélectives ou non suffisamment sélectives peut donc entraîner la mauvaise identification de la BMAA (*i.e.* confondue avec ses isomères ou d'autres molécules interférentes) ce qui aurait participé aux résultats contradictoires rapportés selon Kruger et al. (2012).

Dernièrement, Faassen (2014) a effectué la synthèse des travaux réalisés à ce jour. Elle 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, soit par l'emploi de méthodes non sélectives (*i.e.* FLD), soit par manque d'informations sur les conditions analytiques. C'est particulièrement important puisque l'étude de Cox qui affirmait que 95 % des cyanobactéries produisent de la BMAA est basée sur une détection par FLD non sélective alors qu'aucune méthode très sélective récente n'a pu confirmer ces résultats. Un exemple marquant de ce manque de sélectivité est la différence d'un facteur 400 entre les concentrations rapportées par Cox et al. (2005) (par LC-FLD) et Jiang et al. (2013) (par CL-SM/SM) pour *Leptolyngbya* sp. PCC 73110 (*i.e.* 305 vs. 0,73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW). La présence de BMAA dans le cerveau de patients décédés de maladies neurodégénératives est également conflictuelle puisqu'elle a été rapportée avec des méthodes en spectrométrie de masse en tandem mais manquant de sélectivité (*i.e.* pas d'utilisation des transitions sélectives donc impossible de savoir si la BMAA a été correctement identifiée et distinguée de ses isomères). De plus, toujours selon Faassen, les discussions de plusieurs études ne sont pas suffisamment critiques voire sont orientées en faveur de la présence de BMAA (*i.e.* par le choix sélectif de certaines références et en n'évoquant pas ou peu les études contradictoires).

Pour conclure, l'hypothétique présence de BMAA dans de nombreux écosystèmes et sa production par les cyanobactéries ne peuvent pas être vérifiées avec les données actuelles. Néanmoins, des méthodes avec et sans dérivation sont aujourd'hui validées (Combes et al., 2013; Jiang et al., 2013) avec des sensibilités permettant de détecter quasiment toutes les concentrations de BMAA rapportées à ce jour et des sélectivités maximales. La controverse analytique devrait donc disparaître, d'autant plus

que des étalons internes (e.g. D₃BMAA, D₃DAB, ⁺⁵BMAA) sont de plus en plus utilisés pour améliorer l'identification et la quantification de la BMAA et du DAB.

Une sélection de méthodes analytiques majeures est détaillée en annexe 12.

2.9. Accumulation de la BMAA et ses isomères

2.9.1. Présence dans l'environnement et les microalgues

Comme toutes les toxines, la BMAA et ses isomères sont contenus dans les microalgues qui les produisent (*i.e.* endogènes). Lors de la senescence des blooms ou la lyse cellulaire, ces acides aminés peuvent théoriquement se retrouver dans l'environnement, sous forme dissoute. Ainsi, de la BMAA et du DAB dissous ont été rapportés dans des réservoirs au Nebraska (tableau 9). Cependant, Esterhuizen-Londt et Downing (2011) n'ont pas observé de BMAA dissoute dans un plan d'eau affecté par un bloom de cyanobactéries (*Anabaena* spp.) alors que les cyanobactéries contenaient pourtant de fortes concentrations intracellulaires de BMAA.

Ces résultats suggèrent que la BMAA libre dissoute est négligeable (e.g. due à une dégradation, une adsorption ou une accumulation dans les organismes). Le fait que la BMAA soit majoritairement associée aux protéines pourrait partiellement expliquer ces observations. Cependant, une évaluation plus approfondie de la BMAA dissoute devrait être effectuée avant de tirer des conclusions, surtout que les méthodes qui ont été utilisées ne sont pas très sélectives (*i.e.* SM et FLD).

Tableau 9 : concentrations de BMAA et isomères libres dissous dans des prélèvements d'eau (concentrés par SPE) et de BMAA et isomères sous forme totale (ou liée) dans des prélèvements d'eau ou des blooms de cyanobactéries.

Echantillon (extraction)	Analyse	Concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Référence
BMAA et isomères sous forme dissoute			
Eaux avec bloom (concentration par SPE)	EZFaast-SM	Nd	Esterhuizen-Londt et Downing 2011
Eaux de réservoirs (concentration par SPE)	AQC-FLD AQC-SM/SM	Nd – 25,3 (BMAA) Nd – 21,1 (DAB)	Al-Sammak et al., 2014
BMAA et isomères dans des prélèvements d'eau / blooms de cyanobactéries			
Traits de filet $\geq 90 \mu\text{m}$ (lyse cellulaire)	AQC-SM/SM	0,001 – 0,015*	Jonasson et al., 2010
Prélèvements de microalgues (macération dans solvant)	AQC-SM/SM	Nd – 11,3*	Banack et al., 2012
Blooms de <i>Microcystis</i> spp. (lyse cellulaire)	AQC-SM/SM	2,03 – 7,14*	Jiao et al., 2014
Prélèvement avec <i>Leptolyngbya</i> sp. / Naviculales (lyse cellulaire)	AQC-SM/SM	0,005 – 0,028**	Jiang et al., 2014
Eaux de lacs avec blooms (lyse cellulaire)	DNS-SMHR	Nd – 0,3 (BMAA) Nd – 0,04 (DAB) Nd – 0,06 (AEG)	Roy-Lachapelle et al., 2015
Eaux de surface (lyse cellulaire)	AQC-SM/SM	Nd – 0,006	Lage et al., 2015

Nd : Non détecté ; *BMAA totale ; **BMAA liée aux protéines seulement

Néanmoins, la BMAA a déjà été rapportée dans des prélèvements d'eau (*i.e.* ayant subi une étape de lyse cellulaire donc la dissociation BMAA dissoute/BMAA libérée n'est pas possible) ou des blooms qui contenaient des cyanobactéries (tableau 9). Ces résultats sont importants malgré les concentrations globalement faibles rapportées, puisqu'ils révèlent l'existence de microalgues productrices de BMAA et ses isomères dans l'environnement. Or le phytoplancton est un producteur primaire ubiquitaire situé à la base des réseaux trophiques. Le transfert de BMAA est donc théoriquement possible à travers les différents niveaux des chaînes alimentaires, même si ce mécanisme reste à déterminer.

2.9.2. Présence dans les organismes aquatiques

Bien que les organismes producteurs de BMAA ne soient pas encore clairement identifiés (*cf.* paragraphes 2.1 et 2.8.2), la BMAA et ses isomères ont été rapportés dans de nombreux organismes de différents écosystèmes à travers le monde entier.

Le tableau 10 contient une liste non exhaustive des concentrations de BMAA rapportées dans plusieurs organismes aquatiques, en ayant eu recours à des techniques analytiques sélectives. La BMAA a été détectée dans les eaux saumâtres de la mer Baltique à de nombreuses reprises, dans des mollusques et poissons notamment. Elle a été observée dans certains écosystèmes dulcicoles comme le lac Taihu en Chine, mais aussi dans des poissons en Suède et aux Etats-Unis. Cependant, la BMAA et ses isomères ont majoritairement été retrouvés dans l'environnement marin (e.g. dans des crustacés et huîtres prélevés sur les côtes américaines, des coques collectées au Portugal, des huîtres et moules de l'étang de Thau en Méditerranée, et même dans des cartilages de requins vendus en tant que compléments alimentaires).

Les concentrations rapportées sont assez variables malgré l'utilisation de techniques sélectives (tableau 10). Cependant, elles restent dans le même ordre de grandeur (*i.e.* $\approx \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) contrairement aux très fortes concentrations obtenues par FLD (e.g. jusqu'à $6976 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW rapportés par (Brand et al., 2010) dans un crabe bleu de Floride).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces différences de concentrations : de nombreuses espèces et différents organes ont été analysés, présentant des styles de vie variés (e.g. pélagique, benthique, planctophage, carnivore), provenant de différents écosystèmes (eau douce, saumâtre, salée) soumis à différentes conditions environnementales (e.g. notamment la présence de blooms de microalgues). Malgré tout, l'impact des différences de techniques analytiques ne peut être exclu (e.g. utilisation ou non d'un étalon interne pour corriger les concentrations obtenues).

Tableau 10 : différentes concentrations de BMAA rapportées par des techniques sélectives dans différents organismes.

Organisme (espèce)	Origine	Dérivation	Technique analytique	Concentration totale ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW)	Référence
MOLLUSQUES					
Huîtres et moules (<i>Ostrea edulis</i> , <i>Mytilus edulis</i>)	Mer Baltique	AQC	CL-SM/SM	0,006 – 0,201	Jonasson et al., 2010
Huîtres et moules (<i>Crassostrea gigas</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Méditerranée	AQC	CL-SM/SM	0,6 – 6 (BMAA) 0,7 – 1,8 (DAB)	Masseret et al., 2013
Huîtres et moules (<i>O. edulis</i> , <i>C. gigas</i> , <i>M. edulis</i>)	Mer Baltique France	AQC	CL-SM/SM	0,4 – 4,5*	Jiang et al., 2014b
Huîtres (<i>O. edulis</i>)	Lousiane (eau saumâtre)	AQC	CL-SM/SM	7 – 47	Christensen et al., 2012
Moules (<i>M. edulis</i>)	Mer Baltique	DNS	CL-SM/SM	1,3 – 5,8*	Salomonsson et al., 2013
Moules, palourdes (<i>Anodonta woodiana</i> , <i>Corbicula fluminea</i>)	Chine (eau douce)	AQC	CL-SM/SM	0,8 – 6,7	Jiao et al., 2014
Coques (<i>Cerastoderma edule</i>)	Portugal	AQC	CL-SM/SM	Nd – 0,43	Lage et al., 2014
CRUSTACES					
Langoustes (<i>Panulirus</i> sp.)	Floride	AQC	CL-SM/SM	2,5 – 34 (BMAA) 1,2 – 41 (DAB)	Banack et al., 2014
Crevettes cuites (infra-ordre <i>Caridea</i>)	Suède, nord-Atlantique	AQC	CL-SM/SM	0,55 – 2,3	Jiang et al., 2014b
Crabes, crevettes, écrevisses (<i>Eriocheir sisensis</i> , <i>Macrobrachium nipponense</i> , <i>Procambarus clarkii</i>)	Chine (eau douce)	AQC	CL-SM/SM	0,12 – 8,8	Jiao et al., 2014
Crabes bleus (<i>Callinectes sapidus</i>)	Atlantique-est	AQC	CL-SM/SM	Nd – 115 (BMAA) Nd – 249 (DAB)	Field et al., 2013
Crabes bleus (<i>Callinectes sapidus</i>)	Floride	AQC	CL-SM/SM	4,7 – 14	Christensen et al., 2012
POISSONS					
Eperlan, turbot, hareng, sandre, saumon (<i>Osmerus eperlanus</i> , <i>Scophthalmus maximus</i> , <i>Clupea harengus</i> , <i>Sander lucioperca</i> , <i>Salmo salar</i>)	Mer Baltique	AQC	CL-SM/SM	Nd – 1,3	Jonasson et al., 2010
Carpe, cyprin doré, silure... (<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carassius auratus</i> , <i>Parasilurus asotus</i>)	Chine (eau douce)	AQC	CL-SM/SM	0,07 – 35,9	Jiao et al., 2014
Plie, hareng, omble chevalier (<i>Pleuronectes platessa</i> , <i>Clupea harengus</i> , <i>Salvelinus alpinus</i>)	Mer Baltique, Atlantique	AQC	CL-SM/SM	Nd – 0,10	Jiang et al., 2014b
Cartilage de requin	Vendus dans le commerce	AQC	CL-SM/SM	Nd – 352 (BMAA) 69 – 1483 (DAB) 1300 – 1730 (AEG)	Mondo et al., 2014
Carpe (muscle, foie et cerveau) (<i>Cyprinus carpio</i>)	New Hampshire	AQC	CL-SM/SM	0,043 – 1,3	Banack et al., 2015
Brème, perche, sandre, gardon... (cerveau, muscle) (<i>Abramis brama</i> , <i>Perca fluviatilis</i> , <i>Sander lucioperca</i> , <i>Rutilus rutilus</i>)	Suède	AQC	CL-SM/SM	Nd – 0,015	Lage et al., 2015a

Nd : non détecté ; * concentrations estimées à partir des valeurs rapportées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids humide, sachant que les moules contiennent environ 80 % d'eau

Bien que plusieurs études aient rapporté la détection des isomères de la BMAA [e.g. Lage et al., (2014 et 2015)], peu ont rapporté les concentrations observées.

2.9.3. Interactions toxines et mollusques bivalves filtreurs

2.9.3.1. Généralités

Les bivalves sont des organismes généralement benthiques, sessiles et microphages (*i.e.* se nourrissant de matière organique de petite taille) (His and Cantin, 1995). Ils retiennent les particules en suspension dans l'eau ou récupèrent celles ayant sédimenté en générant un courant grâce à leurs siphons. Leur activité de filtration ne se fait qu'en présence de nourriture, si elle est en concentration suffisamment élevée (Riisgard et al., 2003; Pascoe et al., 2009).

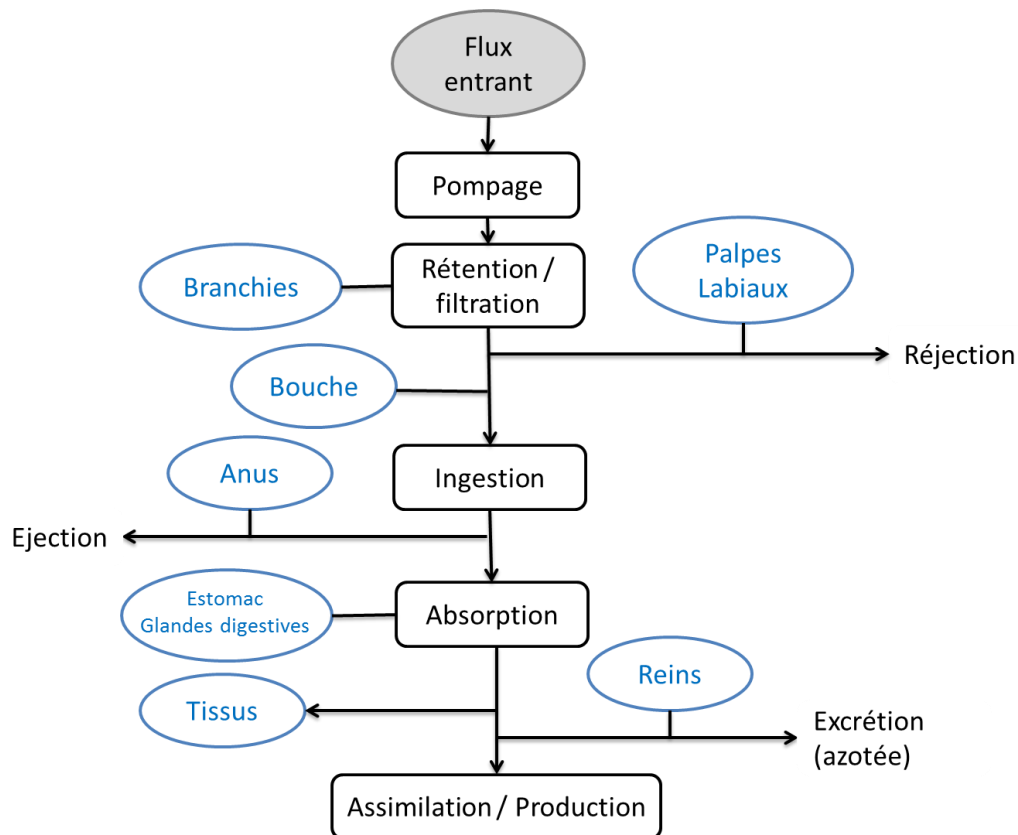


Figure 10 : diagramme simplifié du processus alimentaire chez l'huître creuse et plus généralement pour les mollusques bivalves. Repris de Lassus et al. (2003).

D'après la figure 10, les particules filtrées et retenues par les branchies entrent par la bouche ou sont rejetées (*i.e.* sous forme de pseudofèces après tri par les palpes labiaux), passent ensuite par l'œsophage avant d'être absorbées dans l'estomac et la glande digestive. Une sélection post-ingestion

peut également se faire (Shumway et al., 1985a). La taille des particules est un critère de sélection primordial, mais les bivalves peuvent se nourrir d'organismes présentant une large gamme de taille, allant des bactéries (*i.e.* < 2 μm) jusqu'à certaines espèces de zooplancton (*i.e.* > 200 μm) même s'il est admis qu'une taille supérieure à 4 μm est nécessaire pour obtenir une rétention maximale par les branchies (Riisgard and Larsen, 2010). Les bivalves peuvent donc se nourrir à partir de différentes microalgues. Dans le milieu marin, les diatomées et les dinoflagellés sont les sources d'alimentation principales (Dupuy et al., 2000; Rouillon and Navarro, 2003; Ren et al., 2006; Pernet et al., 2012) alors qu'en eau douce, les chlorophytes, cryptophytes, bacillariophytes et cyanophytes semblent être préférentiellement consommés par *Anodonta cygnea* (Lopes-Lima et al., 2014). Généralement, les particules ingérées reflètent la composition du seston (*i.e.* ensemble des particules dans l'eau). Cependant, il semblerait que les bivalves aient la capacité de sélectionner leur alimentation (e.g. plutôt envers les organismes présentant une meilleure valeur nutritionnelle ou plus facilement assimilables) (Hawkins et al., 1997; Kreeger and Newell, 2001; Lauringson et al., 2014a; Lopes-Lima et al., 2014; Picoche et al., 2014). Trois à six heures après l'alimentation, les premiers résidus de la digestion apparaissent mais on considère que la digestion totale des algues ingérées dure entre 50 et 75 heures (His and Cantin, 1995).

Vus leur mode d'alimentation et leur rôle trophique, les bivalves ont été utilisés pour effectuer des contaminations en conditions contrôlées à de nombreuses reprises, en exposant les organismes à des cyanobactéries ou microalgues marines toxiques en laboratoire.

2.9.3.2. Contaminations expérimentales avec la BMAA et ses isomères

L'accumulation/décontamination de cyanotoxines par les mollusques est bien documentée (tableau 29 annexe 1), sauf pour la BMAA. Récemment, une étude s'est intéressée à ces aspects fondamentaux en exposant quatre espèces de moules d'eau douce à de la $^{5+}$ BMAA dissoute (*i.e.* marquée isotopiquement) (Downing et al., 2014). De la BMAA libre a été retrouvée dans les quatre espèces après 24 ou 48 h d'exposition mais la concentration de BMAA exogène (*i.e.* quantifiée dans le milieu) n'était pas corrélée à celle mesurée dans les chairs totales de moules. Ceci pourrait être expliqué par la catabolisation ou la modification de la BMAA voire par son excrétion via les fèces ou l'urine. Une petite quantité de $^{5+}$ BMAA a en effet été excrétée mais aucune preuve de catabolisation (*i.e.* pas d'augmentation d'isotopes des acides aminés) ni d'incorporation dans les protéines n'ont pu être mises en évidence. Pour expliquer les écarts de concentrations de BMAA (« unaccounted BMAA »), les auteurs

ont suggéré que la BMAA était présente dans les mollusques, liée de façon covalente mais réversible, modifiée et donc indétectable.

Cependant, et comme pour les toxines de microalgues, l'accumulation dans les bivalves à partir de la forme dissoute de BMAA (e.g. la possible bioconcentration) semble mineure dans l'environnement. D'autant plus que de la BMAA dissoute n'a pratiquement jamais été retrouvée dans le milieu (tableau 9). Il est donc nécessaire d'effectuer une contamination en conditions contrôlées, en utilisant des microalgues produisant de la BMAA (et ses isomères).

C'est ce qui a dernièrement été effectué par une équipe portugaise (Baptista et al., 2015). Cette équipe a tout d'abord confirmé la possible accumulation et même bioconcentration⁶ de BMAA libre dans des moules marines après 24 ou 48 h d'exposition avec des concentrations allant de 1 à 5 mg.L⁻¹. De plus, ils ont exposé des moules méditerranéennes (*M. galloprovincialis*) à deux souches de cyanobactéries comme seule source d'alimentation (*i.e.* 10⁵ cellules.mL⁻¹ tous les deux jours, pendant 10 jours) dont une qui contenait des traces de BMAA (non quantifiables). Les concentrations de BMAA totale (*i.e.* obtenues après hydrolyse acide) observées dans les mollusques augmentaient au cours du temps jusqu'à atteindre environ 40 µg.g⁻¹ DW.

Ces résultats sont cependant difficiles à interpréter vue la métabolisation complexe rapportée par Downing et al. (2014) et les concentrations fortes retrouvées dans les moules marines exposées à une souche de cyanobactérie contenant seulement des traces non quantifiables de BMAA. D'autres travaux doivent être effectués pour acquérir des connaissances sur l'accumulation et la métabolisation de la BMAA dans les organismes aquatiques dont les mollusques bivalves.

2.10. Bioaccumulation/biomagnification de la BMAA ?

Parmi les études sur la présence de BMAA dans l'environnement, plusieurs font état d'une bioaccumulation⁷ [e.g. (Brand et al., 2010; Jonasson et al., 2010; Jiao et al., 2014; Lage et al., 2015a)]. Murch et al. (2004a) parlent même de biomagnification de la BMAA sur l'île de Guam (*i.e.* transfert d'une toxine dans un organisme, à partir de sa nourriture, pouvant entraîner une augmentation de la

⁶ Accumulation directe de la forme dissoute d'un composé, qui entraîne une concentration dans l'organisme supérieure à celle dans son milieu

⁷ Accumulation d'un composé dans un organisme en concentration supérieure à celle dans son environnement, par toutes les voies d'exposition (*i.e.* dissoute et alimentation)

concentration de cette toxine à chaque niveau trophique de l'écosystème), exposant ainsi les Chamorros à de fortes concentrations de BMAA, via leurs différentes sources d'alimentation (figure 7).

A ce jour, le mécanisme de bioaccumulation de la BMAA n'est pas connu, bien que l'incorporation dans les protéines ait été suggérée (Murch et al., 2004a). Comme abordé au paragraphe 2.7, la nature de l'association entre la BMAA et les protéines semble finalement plus complexe. Mais en tant que molécule polaire, la BMAA et ses isomères ne semblent pas être bioaccumulables dans les tissus adipeux [*i.e.* un mécanisme classique de bioaccumulation des molécules lipophiles comme les polychlorobiphényles ou PCB, (Burreau et al., 2006)].

Néanmoins, certains chercheurs ont proposé des schémas de transfert de la BMAA au sein des écosystèmes qu'ils ont étudiés (Jonasson et al., 2010; Jiao et al., 2014). Dans ces schémas hypothétiques (figure 11), les cyanobactéries constituent les organismes primaires alors que le zooplancton représenterait un vecteur important.

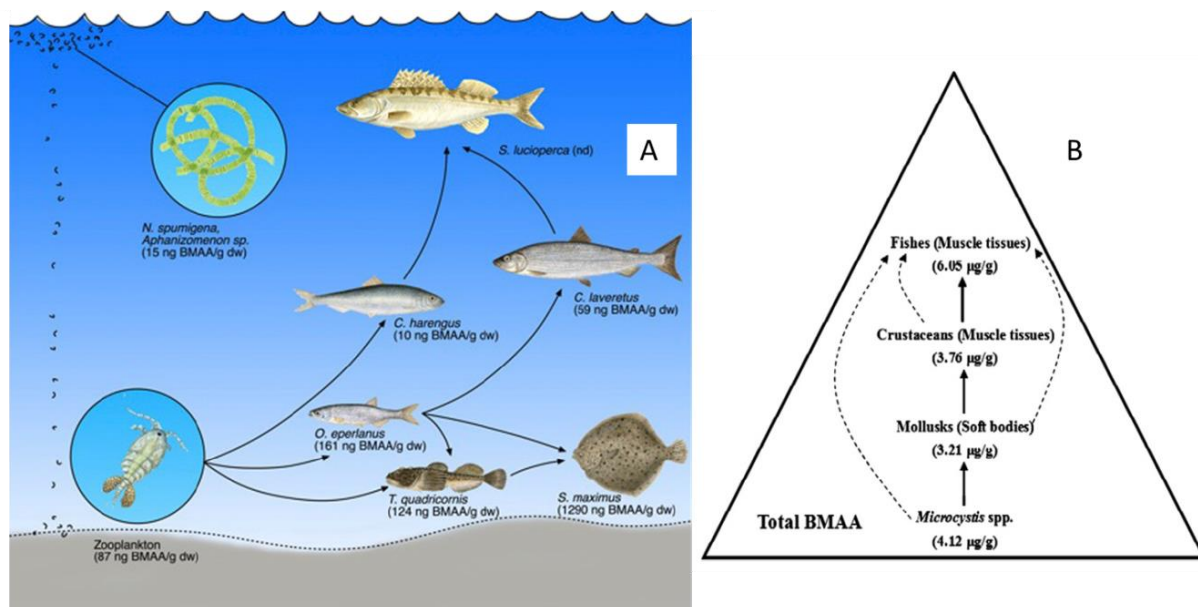


Figure 11 : schémas hypothétiques de transfert de la BMAA dans une chaîne alimentaire de (A) la mer Baltique et (B) le lac Taihu en Chine. Repris de Jonasson et al. (2010) et Jiao et al. (2014), respectivement.

Les résultats de ces deux études montrent une biomagnification de la BMAA entre les cyanobactéries et les poissons prédateurs. Cependant, cette accumulation de BMAA n'est observée que pour la partie benthique de la chaîne alimentaire en mer Baltique (*i.e.* la quantité maximale de BMAA a été retrouvée dans le turbot (*Scophthalmus maximus*) alors que le sandre (*Sander lucioperca*) n'en

contenait pas). Cette particularité pourrait être liée à la sédimentation des blooms de cyanobactéries selon les auteurs. Ils appuient cette théorie en précisant que les bivalves filtreurs benthiques, huîtres et moules, contenaient également des concentrations de BMAA qu'ils estiment être fortes. Par conséquent, tous les organismes de la chaîne trophique de la mer Baltique étudiée ne contenaient pas de BMAA au moment de leur prélèvement, suggérant que des mécanismes de régulation existent, probablement liés aux niches écologiques, à l'âge et aux styles de vie des organismes (Jonasson et al., 2010).

Une étude récente rapporte également le transfert de BMAA dans un lac suédois eutrophisé (Lage et al., 2015a). Les auteurs ont conclu que le mode d'alimentation (*i.e.* plancti-benthivore) et l'âge des organismes étaient des facteurs importants dans les teneurs en BMAA retrouvées dans les poissons. Ces résultats et ceux pour la mer Baltique sont à nuancer puisque les concentrations rapportées, considérées fortes pour les auteurs, sont jugées relativement faibles par la communauté scientifique alors que les auteurs n'ont pas précisé les limites de détection de leurs méthodes dans les matrices quantifiées (Faassen, 2014; Jiang et al., 2014b).

Finalement, peu d'études ont étudié le transfert de BMAA le long des réseaux trophiques. A l'exception de Jiang et al. (2014b) et Lage et al. (2014 et 2015) les cyanobactéries ont toujours été suggérées comme étant à l'origine de la contamination observée, même dans les milieux marins où elles ne semblent pas constituer une ressource alimentaire importante pour les organismes planctophages [e.g. à Thau (Pernet et al., 2012)]. Néanmoins, il n'est pas clairement établi que les cyanobactéries produisent de la BMAA alors que la bioaccumulation de la BMAA dans un organisme, à partir de sa consommation de microalgues contenant de la BMAA, n'a pas été prouvée à ce jour. Ce sont donc seulement des bioaccumulations indirectes qui ont été rapportées.

La découverte récente de BMAA dans les diatomées et dinoflagellés ouvre de nouvelles perspectives ainsi que de nouvelles voies de bioaccumulation, notamment pour les organismes marins (e.g. bivalves filtreurs). C'est pourquoi nous avons mené au laboratoire une étude de bioaccumulation de BMAA et/ou de ses isomères en utilisant des cultures de microalgues, dont une diatomée productrice de BMAA (*i.e.* *Phaeodactylum tricornutum*).

3. Risques et réglementations liés à la BMAA

Les voies d'exposition aux cyanotoxines sont théoriquement applicables à la BMAA et ses isomères (voir annexe 1).

Comme suggéré sur l'île de Guam, la consommation d'organismes contaminés pourrait constituer la voie d'exposition majeure à la BMAA. En effet, cette neurotoxine a été rapportée dans de nombreux organismes aquatiques constituant des ressources alimentaires pour l'homme : poissons, crustacés, mollusques bivalves (Jonasson et al., 2010; Christensen et al., 2012; Lage et al., 2014). Cependant, la cuisson des aliments pourrait réduire la quantité de BMAA dans les crustacés, si jamais l'eau de cuisson n'est pas consommée (Field et al., 2013; Banack et al., 2014). Alors que certains n'ont pas retrouvé de BMAA dans de la spiruline vendue comme compléments alimentaires (McCarron et al., 2014), d'autres en rapportent (Glover, 2014). Néanmoins ces deux études s'accordent sur la présence des isomères de la BMAA (*i.e.* DAB et AEG dont les toxicités sont méconnues) dans les 15 compléments alimentaires qui ont été testés.

L'exposition de l'homme pourrait également se faire par ingestion d'eau contaminée. Néanmoins, peu de cyanobactéries et autres microalgues ont été confirmées productrices de BMAA par des techniques sélectives (Berntzon et al., 2013; Jiang et al., 2013; Jiang et al., 2014a).

Enfin, certains estiment que l'exposition par aérosolisation est à considérer (Stommel et al., 2013; Banack et al., 2015)

Aujourd'hui, aucune réglementation n'existe concernant la BMAA. Les données toxicologiques, notamment par voie orale sont peu nombreuses. Il n'est donc pas possible d'estimer de dose tolérable journalière (TDI, tolerable daily intake) (Jiang et al., 2014b).

Chapitre 2 : Développement d'une méthode HILIC-SM/SM pour l'analyse de la BMAA et ses isomères

1. Contexte

Comme exposé au chapitre 1 paragraphe 2.8.2, l'analyse de la BMAA soulève de nombreuses questions, en fonction des méthodes de détection utilisées. Pour rappel, il y a trois méthodes analytiques principales qui ont été employées pour détecter la BMAA, (i) dérivation et analyse/détection par CL-FLD, (ii) dérivation et analyse/détection par CL-SM/SM et (iii) analyse/détection par CL-SM/SM sans dérivation (*cf.* chapitre 1 paragraphe 2.8).

Le faible poids moléculaire (*i.e.* 118 Da) et sa polarité ne rendent pas simples l'analyse de la BMAA (e.g. pas de rétention sur les colonnes chromatographiques « classiques » en phase inverse). De plus, celle-ci se complique davantage en raison de l'existence d'au moins trois isomères naturels (*i.e.* DAB, AEG et BAMA) et de nombreuses autres molécules (> 50 d'après certains auteurs) qui peuvent interférer avec son identification. Ainsi, Faassen et al. (2012) ont prouvé que la CL-FLD manquait de sélectivité et pouvait générer des faux-positifs à l'inverse des méthodes très sélectives (*i.e.* CL-SM/SM). De ce fait, le constat de Cox et al. (2005) qui suggérait que 95 % des cyanobactéries produiraient de la BMAA mérite d'être revu, à la lumière des résultats obtenus par les méthodes d'analyse plus selectives.

2. Approche méthodologique et objectifs

Dans ce contexte, et en prenant en considérations les diverses recommandations rapportées par de nombreux chercheurs (e.g. Rosen et Hellenas., 2008; Cohen et al., 2012; Faassen et al., 2012; Jiang et al., 2012; Faassen et al., 2014), nous avons dans un premier temps optimisé et caractérisé chaque étape, de l'extraction à l'analyse, pour obtenir une méthode très sélective et sensible d'analyse de la BMAA et ses isomères par CL-SM/SM. Face aux contraintes de la dérivation (e.g. moins bonne séparation chromatographique, rendements à optimiser, détection des dérivés et non des molécules directement) et puisque la préparation d'échantillons comporte déjà de nombreuses étapes, nous avons décidé d'utiliser une chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) pour séparer la BMAA et ses isomères. La méthode a été ensuite appliquée à l'ensemble des échantillons au cours de ces travaux de thèse.

Voici l'approche que nous avons choisie (figure 12). Au laboratoire, nous disposons d'un spectromètre de masse API 5500QTRAP® (ABSciex), conçu pour l'analyse de petites molécules à l'état de trace dans des échantillons biologiques. Il est donc particulièrement adapté à l'analyse de la BMAA (et ses isomères) et son triple quadripôle nous permettra d'avoir une sélectivité maximale.

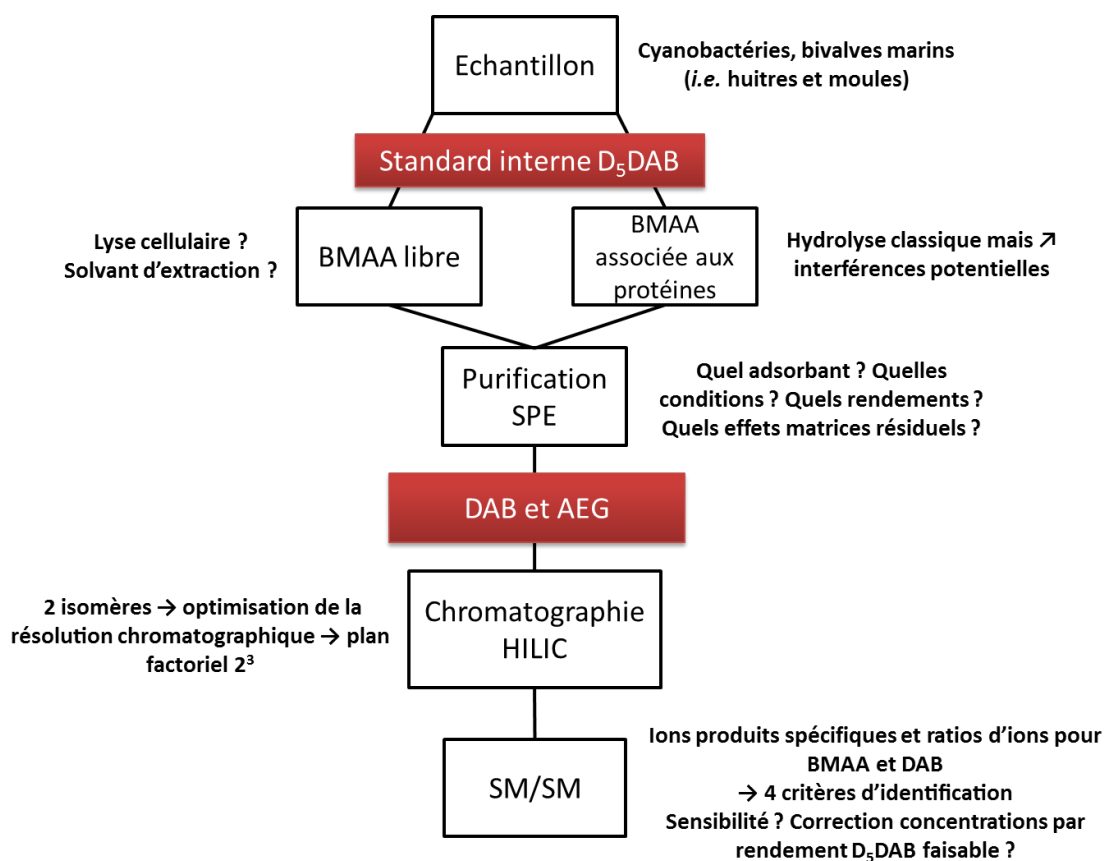


Figure 12 : approche méthodologie pour la mise en place d'une méthode HILIC-SM/SM pour l'identification non ambiguë et la quantification précise de la BMAA et ses isomères, sous forme libre et associée aux protéines, dans les matrices de cyanobactéries, huîtres et moules.

La finalité de ce développement est d'obtenir une méthode HILIC-SM/SM fiable, sensible, très sélective et répétable pour nous permettre :

- de cribler des cultures de cyanobactéries, dont certaines rapportées productrices de BMAA, pour confirmer ou infirmer l'hypothèse de Cox et al. (2005)
- d'étudier la cinétique de production de BMAA et isomères par ces cyanobactéries en culture
- d'évaluer la présence de BMAA et isomères dans des mollusques de la lagune de Thau avec notre méthode, *i.e.* BMA et DAB précédemment rapportés par Masseret et al. (2013) dont l'analyse avait été réalisée par le groupe de Cox et impliquait une dérivation pré-analyse)

3. Beta-N-Methylamino-L-Alanine: LC-MS/MS Optimization, Screening of Cyanobacterial Strains and Occurrence in Shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon

Article publié : Reveillon, D., E. Abadie, V. Sechet, L. Brient, V. Savar, M. Bardouil, P. Hess and Z. Amzil (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* 12(11): 5441-5467.

3.1. Résumé

La BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) est un acide aminé non protéique neurotoxique potentiellement impliqué dans certaines maladies neurodégénératives. Elle peut être produite par des cyanobactéries mais est également retrouvée dans les organismes aquatiques consommés. Par conséquent, l'homme pourrait être largement exposé à cette toxine.

Cependant, l'analyse chimique de la BMAA et de ses isomères est controversée, en grande partie du fait d'un manque de sélectivité des méthodes utilisées. En utilisant un plan factoriel nous avons optimisé la séparation chromatographique des analytes non dérivés, par une méthode associant la chromatographie liquide d'interactions hydrophiles avec la spectrométrie de masse en tandem (HILIC-MS/MS). En combinant une étape de purification par extraction sur phase solide (Solide Phase Extraction, SPE) à une résolution chromatographique appropriée des molécules et l'utilisation de transitions de spectrométrie de masse spécifiques, nous avons développé une méthode analytique très sélective et sensible pour l'identification et la quantification de la BMAA et ses isomères (sous forme libre et liée) dans des matrices de cyanobactéries et mollusques (avec une limite de quantification, LOQ, de 0,225 et 0,15 $\mu\text{g/g}$ de poids sec, respectivement).

Dix espèces de cyanobactéries (dont six sont considérées comme produisant de la BMAA) ont été criblées en utilisant cette méthode. Tandis que la BMAA n'a pas été détectée, le DAB, un isomère, a été retrouvé sous forme libre et liée dans pratiquement tous les échantillons. Des moules et des huîtres collectées en 2009 dans l'étang de Thau ont également été criblées. La BMAA et deux de ses isomères, le DAB et l'AEG, ont été retrouvés dans tous les échantillons sous forme liée (entre 0,6 et 14,4 $\mu\text{g/g}$ de poids sec) alors que seulement quelques échantillons contenaient de la BMAA sous forme libre.

3.2. Abstract

β -*N*-methylamino-L-alanine (BMAA) is a neurotoxic non-protein amino acid suggested to be involved in neurodegenerative diseases. It was reported to be produced by cyanobacteria, but also found in edible aquatic organisms, thus raising concern of a widespread human exposure.

However, the chemical analysis of BMAA and its isomers are controversial, mainly due to the lack of selectivity of the analytical methods. Using factorial design, we have optimized the chromatographic separation of underivatized analogues by a hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) method. A combination of an effective solid phase extraction (SPE) clean-up, appropriate chromatographic resolution and the use of specific mass spectral transitions allowed for the development of a highly selective and sensitive analytical procedure to identify and quantify BMAA and its isomers (in both free and total form) in cyanobacteria and mollusk matrices (LOQ of 0.225 and 0.15 $\mu\text{g/g}$ dry weight, respectively).

Ten species of cyanobacteria (six are reported to be BMAA producers) were screened with this method, and neither free nor bound BMAA could be found, while both free and bound DAB were present in almost all samples. Mussels and oysters collected in 2009 in the Thau Lagoon, France, were also screened, and bound BMAA and its two isomers, DAB and AEG, were observed in all samples (from 0.6 to 14.4 $\mu\text{g/g}$ DW), while only several samples contained quantifiable free BMAA.

Keywords

Cyanotoxins; BMAA; DAB; AEG; HILIC-MS/MS; cyanobacteria; bivalve mollusks; French Mediterranean

3.3. Introduction

β -*N*-methylamino-L-alanine (BMAA) is a non-protein amino acid that was discovered in 1967 from the seeds of *Cycas micronesica* on the island of Guam [1]. This neurotoxic compound [2] was suggested to be linked to the high incidence of amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) observed among the native Chamorro people. This hypothesis was later criticized and rejected [3] and subsequently reinforced in the early 2000s. At this time, a group demonstrated successively that BMAA can be produced by a symbiotic cyanobacteria (*Nostoc* sp.) [4], that BMAA can be biomagnified within the Guam ecosystem, from cyanobacteria to the brains of people who died from ALS/PDC [4–6], and that large amounts of BMAA can be released from proteins after total acid hydrolysis of samples [5].

After Cox et al. [7] reported that almost all cyanobacteria can produce BMAA, other groups have found BMAA in different ecosystems all around the world [8–12], and three patterns of biomagnification were also suggested, respectively, in the Baltic Sea [13], in the Florida Bay [14] and in Lake Taihu, China [15]. Taken together with the observation of BMAA in the brains of Canadian patients who suffered from several neurodegenerative diseases [16], these findings suggested a possible widespread human exposure to the BMAA neurotoxin and its global implication in ALS and also in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. However, the presence of BMAA in cyanobacteria and other matrices is controversial [17,18]. Indeed, the classically-used fluorescent mode of detection after derivatization of samples is known to lack selectivity [19], and high amounts of BMAA were reported with this method (up to 7000 µg/g dry weight). On the opposite side, when more selective methods, like LC-MS/MS, were employed, concentrations or even the presence of BMAA were not confirmed [12,19–22]. The derivatization allows for an increase of the molecular weight of molecules, thus reducing the background signal while improving the ionization efficiency with electrospray ionization systems [23]. Nevertheless, the derivatization is not specific; it affects the chromatographic separation and leads to the indirect detection of BMAA [17]. Discrepancies observed among the BMAA concentrations reported likely originate from the lack of selectivity of the methods employed and not because of the use of a derivatization step [18]. Indeed, highly selective methods have been validated for BMAA and analogues [24,25].

The existence of at least three natural isomers, 2,4-diaminobutyric acid (DAB), N-2-aminoethylglycine (AEG) and β-amino-N-methyl-alanine (BAMA), can be partly involved in BMAA controversy and highlighted the requirement of highly selective methods to unambiguously detect and quantify BMAA from its isomers. DAB is a neurotoxic isomer of BMAA [17] that was first found in cyanobacteria in 2008 [22], but it has also been widely reported in prokaryotes and eukaryotes [23]. Among all known isomers of BMAA, AEG and BAMA were selected by two groups for method development, because they could potentially interfere with BMAA analysis [26,27]. Indeed, AEG was found in cyanobacteria, and its production was suggested to be highly conserved [28], while BAMA was observed in mollusks of the Baltic Sea [27]. The toxicity of these two isomers has not been studied so far, especially for AEG.

To date, two papers have reported BMAA in cyanobacteria with selective MS/MS methods using a derivatization of samples [25,29]. Recently, BMAA was also reported to be produced by diatoms and dinoflagellates [30–32]. However, the free form of BMAA was not considered. It is unclear why the free form of BMAA is no longer analyzed, since it seems reasonable to assume that biomagnification could more easily originate from the free rather than the bound form of BMAA. Indeed, Dunlop et al. [33] have

reported that free BMAA can be misincorporated into human neuroproteins instead of serine in an in vitro cell line, and this incorporation into proteins had been initially postulated as the mechanism of the bioaccumulation of BMAA in the Guam ecosystem [5].

BMAA is a small molecule that can be directly detected by mass spectrometry (MS), but the use of a derivatization step is also chosen by some groups, followed by either fluorescent (FLD) or MS detection. To cope with the complexity of biological matrices and the controversy arising from detecting trace amounts of BMAA, we aimed at the development of a highly selective and sensitive LC-MS/MS method to confidently quantify both free and bound forms of BMAA, DAB and AEG. Thus, following the recommendations of Cohen [34], we included a solid phase extraction (SPE) clean-up step in the sample preparation procedure and the use of an isotopically labeled molecule (*i.e.*, deuterated D₅DAB) as the internal standard. There are ongoing debates about the use of a derivatization step [17,20,23]. While the derivatization approach is interesting in combination with mass spectrometry, there is little information in the literature on the derivatization yield for BMAA [34]. A lot of compounds can react with the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent during the derivatization process [17]. Furthermore, the analysis of BMAA and analogues is already rather complex, and any additional step could contribute to recovery losses and add variability to the method. Additionally, the chromatographic separation of the derivatized analogues is poor compared to that of the underivatized compounds [17]. We therefore chose not to use a derivatization step in our analytical approach. We decided to optimize the analysis of underivatized BMAA and isomers (DAB and AEG) with HILIC chromatography coupled to a sensitive triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP 5500 system). This optimized procedure was then applied to screen ten species of cyanobacteria and nineteen samples of mollusks collected in 2009 in Thau Lagoon, French Mediterranean, where BMAA and DAB were recently reported in mussels and oysters with an LC-MS/MS method employing derivatization of the samples [35].

3.4. Results and discussion

3.4.1. Optimization of the Analysis of BMAA and Isomers

The analysis of BMAA requires several steps. After performing cell lysis in an adapted solvent, samples should be cleaned up using an SPE procedure to remove interfering compounds and then injected into an LC-MS/MS system to take advantage of the higher selectivity of this hyphenated technique. BMAA can be extracted either as the free or as the bound form. To release the BMAA bound to proteins, an acid hydrolysis step has to be added before SPE clean-up.

3.4.2. Cell Lysis and Solvent Extraction

To extract cyanotoxins, including BMAA (both in free and protein-bound form), cells have to be disrupted in a solvent facilitating the solubilization of the analytes. Generally, freeze-thawing and maceration [36] or sonication [37] in an appropriate solvent were employed. However, the cell lysis of cyanobacteria can be hard to achieve [38]. Using a mixer mill, excellent disruption of cyanobacteria was observed (checked by microscopic observation). The protocol, proposed by Serive et al. [39], was adapted to extract polar and basic compounds from freeze-dried material.

To select an adapted solvent of extraction, both freeze-dried cyanobacteria *Leptolyngbya* PCC 73110 and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) were spiked in triplicate with BMAA and D₅DAB before grinding and extracted with five solvents. To date, different solvents have been used to extract free, bound or total BMAA [34]. We compared the recoveries for free BMAA and its isomers between formic acid (FA) 0.1%, acetic acid (AA) 0.1%, trichloroacetic acid (TCA) 0.1 M, methanol (MeOH) and MeOH/water-FA 0.1% (50:50, v/v). The solvents were chosen accordingly to the literature: e.g., TCA 0.1 M is classically used to extract BMAA [34]; acetic acid is employed to extract paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins (basic polar compounds) [40]; while MeOH is known to be able to extract marine toxins of a wide range of lipophilicity from wet algae [41]. The samples were analyzed after SPE clean-up as detailed in the Experimental Section (Subsection 3.3.2). The results obtained were expressed relatively to the recoveries in the TCA 0.1 M for cyanobacteria and mussel matrices (Figure 13), because it is widely used to extract free BMAA.

For D₅DAB, all solvents, but pure MeOH ($p < 0.001$), gave similar recoveries. For BMAA, the performances of acidic solvents are alike (except FA 0.1% with cyanobacteria), but lower recoveries were observed in the presence of methanol. The poor recoveries obtained with pure methanol for both matrices were expected, as BMAA and D₅DAB are polar compounds. Indeed, the recoveries of pure standards were only about 70% (Figure 14) when using methanol as the extraction solvent, which may indicate low solubility and/or adsorption to glass vials, as suggested by Cohen [34]. Considering the recoveries of standards (Figure 14) and the recoveries obtained with spiked matrices (Figure 13), we chose TCA 0.1 M as the solvent for the extraction of free BMAA and isomers.

Subsequently, the protocol was adapted to extract total rather than the bound form of analytes, since the precipitation of proteins is time-consuming and difficult [34]. The classical acid hydrolysis in boiling hydrochloric acid (HCl) 6 M [5] was performed following extraction with TCA 0.1 M.

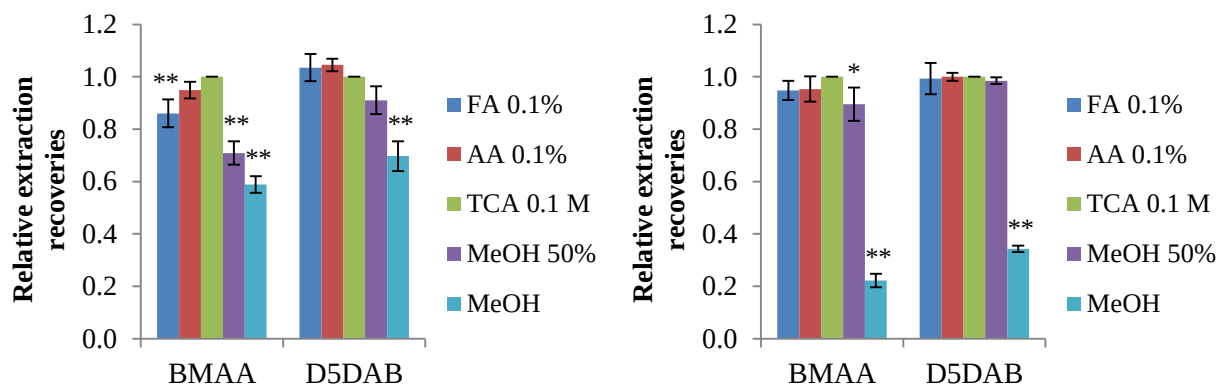


Figure 13 : extraction recoveries of BMAA and D₅DAB spiked at 30 ng/mL in (A) cyanobacteria and (B) mussel matrix with five different solvents (n = 3, error bars represent standard deviations). Results are expressed relatively to the recoveries in trichloroacetic acid (TCA) 0.1 M. * p < 0.01 and ** p < 0.001 compared to TCA 0.1 M. FA, formic acid; AA, acetic acid.

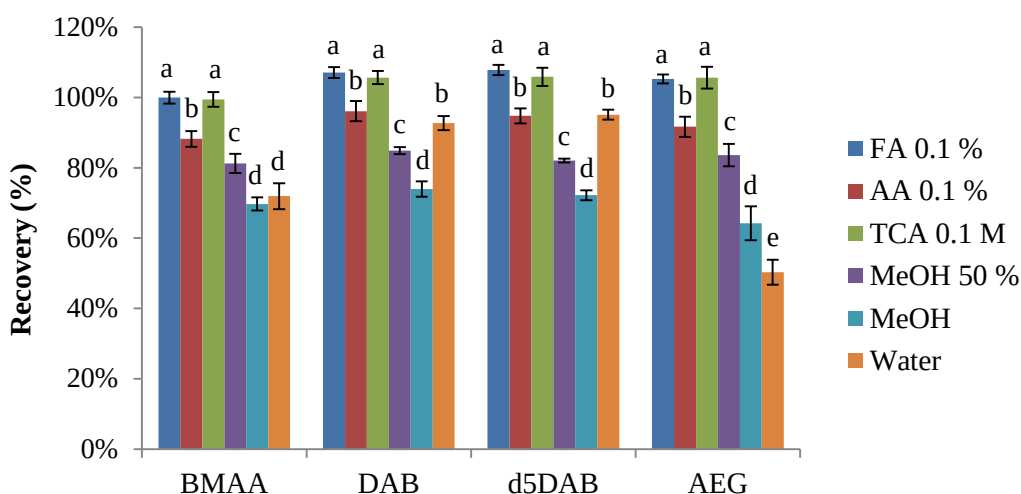


Figure 14 : recoveries of pure standards spiked at 30 ng/mL in different extraction solvents (n = 3, error bars represent standard deviations). Replicates with the same letter are not significantly different, while replicates with different letters are significantly different (p < 0.05).

3.4.3. Comparison of Solid Phase Extraction (SPE) Sorbents

The SPE clean-up step is necessary to remove co-eluting interfering compounds that cause matrix effects during LC-MS/MS analysis while concentrating samples [42–45]. As basic amino acids, BMAA and isomers (DAB, D₅DAB and AEG) can be purified with cation-exchange sorbents, such as Strata SCX (Strong cation exchange) [46], or mixed-mode sorbents, like Oasis® MCX [21] or Isolute® HXC-3 [25]. Here, the widely-used Oasis® MCX [21,24,45] was compared to its Agilent equivalent, Bond Elut® Plexa PCX sorbent (Agilent Technologies, Les Ulis, France), for the recovery of the standards (Figure 15).

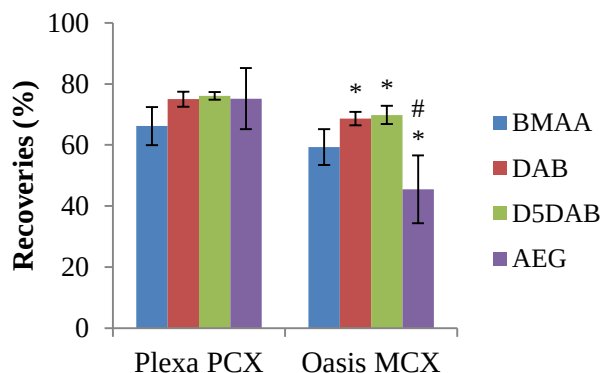


Figure 15 : recoveries of mixed solutions of standards spiked in TCA 0.1 M at a final concentration of 30 ng/mL. Comparison between 60 mg/3cc Plexa PCX and Oasis® MCX cartridges (n = 3, error bars represent standard deviations). * p < 0.05 compared to recoveries with Plexa PCX. # p < 0.005 compared to D₅DAB and DAB with Oasis® MCX.

Recoveries with Plexa PCX were better than those obtained with Oasis® MCX cartridges (p < 0.05), except for BMAA. The recoveries obtained here with Oasis® MCX were lower than those obtained for BMAA and DAB by other groups [24,45], possibly related to small differences in protocols. As extraction was performed in TCA 0.1 M, we decided to directly percolate samples in TCA after activation of the cartridges (2 mL of MeOH, then 1 mL of TCA 0.1 M). Indeed, due to their pKa (>6.5) [45], the pH of TCA 0.1 M allows for the ionization of ammonia groups and, hence, retention of positively-charged molecules on the sorbent. To increase recoveries (especially for AEG; data not shown), we used an elution solvent consisting of a mixture of MeOH/NH₄OH (93:7 instead of 95:5, v/v). Finally, as trace levels of BMAA and isomers (about 15% of the concentration of the spiking solution) were found in fractions eluting after the 3 mL used by Combes et al. [24], an additional 1 mL was used for the elution step.

It has to be noted that an unknown peak eluted close to the AEG retention time in blank (1 mL TCA 0.1 M) passed through both types of cartridges during LC-MS/MS analysis. However, this unknown compound originating from sorbents is different from the one reported by Li et al. with the Strata-X-C cartridge [45], since only the transition m/z 119 > 102 gave a signal. To accurately quantify AEG, the peak area of this interfering compound was subtracted from the peak area of AEG in samples.

The SPE clean-up procedure with PCX cartridges, as described in the Experimental Section (Subsection 2.6.3), was applied to all samples after extraction of both free and total BMAA and its isomers.

3.4.4. Optimization of Selectivity: Chromatographic Resolution and Mass Spectral Transitions

Among cyanobacterial toxins, BMAA is a compound that has caused controversy, due to the confusion arising from interferences in the analytical determination [18]. Indeed, at least three isomers of BMAA—2,4-diaminobutyric acid (DAB), *N*-2-aminoethylglycine (AEG) and β -amino-*N*-methyl-alanine (BAMA)—can be found in biological matrices [12,25,30,32]. The large discrepancies of BMAA concentrations observed between studies were suggested to come mainly from the lack of selectivity of the methods that have been used [18]. Therefore, we decided to maximize both chromatographic resolution and the selectivity of mass spectral transitions during the method development.

To have a proper identification of BMAA and isomers, chromatographic resolution has to be reached, since the common mass spectral transition m/z 119 > 102 is used to quantify underivatized samples. For this purpose, a gradient elution with a ZIC®-HILIC column was optimized using a 2^3 factorial design. The main effect and interaction of three variables, namely acetonitrile (ACN) at the start of gradient (60%–70%), oven temperature (25–35 °C) and the slope of the gradient (0.8%–1.5% ACN/min), were studied on BMAA/DAB and DAB/AEG resolutions. Injections were made twice, which led to 16 experiments, and then, a response surface was generated (Figure 16).

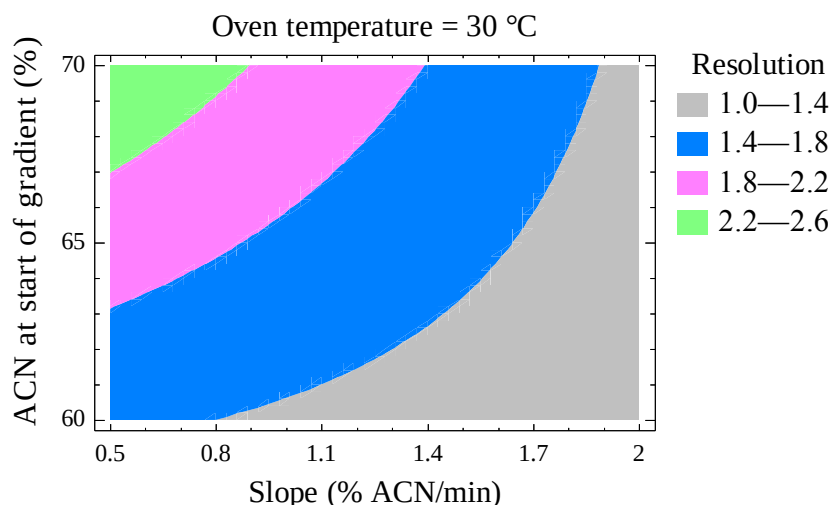


Figure 16 : chromatographic resolution between BMAA/DAB, optimized using a 2^3 factorial design. Since temperature did not influence the resolution significantly, it was set to 30 °C. A resolution of 1.5 corresponds approximately to the baseline resolution. ACN, acetonitrile.

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) columns are designed to efficiently separate polar compounds [47]. The ZIC®-HILIC column has been successfully used to separate BMAA and DAB [11,19,22,24], and the response surface obtained after the factorial design here clearly shows

that excellent resolutions can be achieved with this column for underivatized molecules (BMAA, DAB and also AEG). Conditions were set to have a baseline resolution of 1.5 between molecules, as can be seen in Figure 17. Peak maxima were ca. 2 min apart, with a baseline separation of 1 min typically being achieved, thus reducing the risk of misidentification of BMAA, DAB and AEG, while limiting the co-elution of interfering compounds causing matrix effects.

Classically, LC-MS/MS analysis is preferred to quantify BMAA, because of the four criteria for the identification of molecules (retention times, parent ion, product ion(s) and ion ratios) [18]. For maximum selectivity, we decided to consider not only one (as methods involving derivatization do [25]), but two specific (qualitative) transitions for BMAA and DAB and the ratios between qualitative and quantitative ions (respectively, m/z 119 to m/z 88 and 76 for BMAA and m/z 119 to m/z 101 and 74 for DAB; ratios 88/102, 76/102, 101/102 and 74/102). For AEG, no specific mass spectral transition was found (m/z 119 > 41 was specific, but suffered from a high background signal). Generally, the ratios of the qualifier ion(s) to the quantifier ion that are used to confirm the identity of molecules in samples should be within a 10% error range of the ratios of standards [27], which was the case in our study (Table 12). Finally, we have developed a highly selective method to confidently identify BMAA and isomers in biological samples.

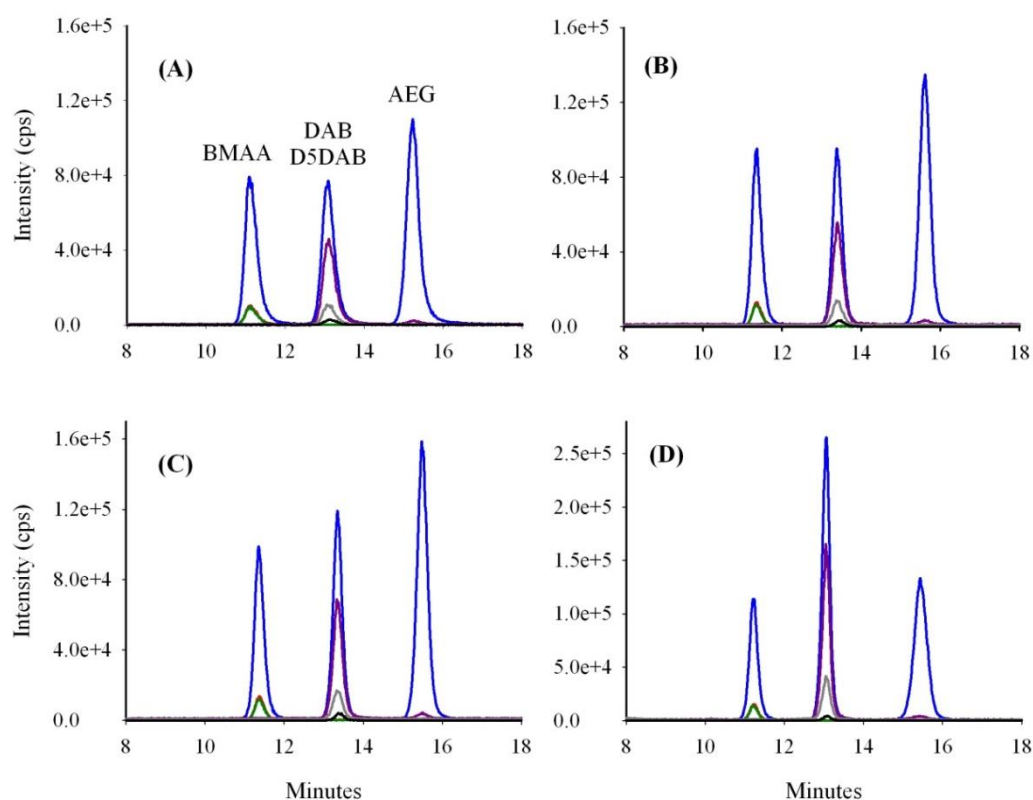


Figure 17: chromatograms of BMAA, D₅DAB and AEG spiked at 50 ng/mL into (A) standards, (B) cyanobacteria, (C) oyster and (D) mussel matrices after extraction of free analytes. Colored lines represent mass spectral transitions at m/z 119 to m/z 102 (blue), 88 (red), 76 (green), 101 (purple), 74 (grey) and m/z 124 to m/z 47 (dark).

3.4.5. Characterization of the Analytical Procedure

3.4.5.1. Recoveries of SPE Clean-Up and Remaining Matrix Effects

SPE recoveries and matrix effects were assumed to have a significant impact on the analysis of BMAA and isomers. We aimed to screen cyanobacteria, but also mollusks, for the presence of BMAA, DAB and AEG. After the selection of the Plexa PCX cartridge, recoveries of the SPE clean-up with representative matrices (cyanobacteria, oyster and mussel) and the remaining matrix effects were assessed for extraction procedures of both free and total BMAA and isomers (Table 11).

Table 11 : 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 3.5.5.

Extraction	Matrix	Recoveries of SPE Clean-Up (mean% $\pm$ SD)				Matrix Effect (%)			
		BMAA	DAB	D ₅ DAB	AEG	BMAA	DAB	D ₅ DAB	AEG
Free analytes	Cyanobacteria	61.1 $\pm$ 4.9	51.0 $\pm$ 5.6	61.0 $\pm$ 1.6	48.1 $\pm$ 5.5	8.8	5.6	4.7	9.3
	Oyster	56.1 $\pm$ 4.5	64.5 $\pm$ 4.5	65.4 $\pm$ 4.5	63.1 $\pm$ 3.8	7.3	0.9	-3.5	0.2
	Mussel	63.8 $\pm$ 3.1	79.0 $\pm$ 6.8	75.6 $\pm$ 5.7	73.3 $\pm$ 2.1	5.3	-6.3	1.2	0.7
Total analytes	Cyanobacteria	67.6 $\pm$ 3.3	63.1 $\pm$ 1.9	63.4 $\pm$ 7.5	59.5 $\pm$ 1.0	3.8	1.9	4.2	-9
	Oyster	71.0 $\pm$ 2.0	76.4 $\pm$ 9.5	81.1 $\pm$ 4.1	74.0 $\pm$ 6.4	7.5	3.5	3	3.6
	Mussel	64.3 $\pm$ 8.0	65.0 $\pm$ 8.1	73.1 $\pm$ 6.5	64.3 $\pm$ 0.9	8.7	12.1	15.7	-5.5

Bond Elut® Plexa PCX is a mixed-mode SPE sorbent, which contains a highly polar polymeric cation-exchange resin with strong cation exchange functionalities. According to the manufacturer [48], Plexa PCX removes neutral and acidic interferences from the matrix and concentrates basic analytes, like BMAA and isomers. Ion suppression is reduced, because the highly polar, hydroxylated polymer surface is entirely amide-free and does not provide binding sites for endogenous species, such as proteins and lipids.

Recoveries of BMAA and isomers are globally within the same range ($\geq 60\%$). Surprisingly, recoveries of analytes from cyanobacterial matrix were on average lower than those from the two more complex mollusk matrices. The cation-exchange functionality did not suffer from the higher content of amino acids in samples after acid hydrolysis, since similar recoveries were observed for the extraction of both free and total amino acids. A decrease of SPE recoveries due to the presence of matrix components can be seen in comparison with recoveries obtained with standards, as shown by Kasprzyk-Hordern [49]. Recoveries obtained for BMAA and DAB are comparable to those reported by other groups using Oasis®

MCX cartridges and HILIC-MS methods to analyze cyanobacteria (>70% for Li et al. [45] and Combes et al. [24], but >80% for Kubo et al. [21]). Overall, the recoveries of the methods reported in the literature for the quantification of BMAA in cyanobacteria are generally better without SPE clean-up; however, matrix effects have not always been evaluated [19,20]. We could not find any information on SPE recoveries of underivatized analytes in mollusk matrices.

The matrix effects of BMAA and especially its isomers are not well documented. Li et al. [45] have reported no effect on BMAA, but DAB suppression with hydrolyzed cyanobacterial matrix, while strong matrix effects (>30%) were still present after SPE clean-up of cyanobacteria and biofilms in the procedure of Combes et al. [24]. Due to previous studies in our laboratory [50], matrix effects caused by mollusks were assumed to be higher than those caused by microalgae. However, this was not the case for this analyte-matrix combination.

After our SPE clean-up protocol, the remaining matrix effects, *i.e.*, signals suppression or enhancement in the electrospray interface of LC-MS/MS, were relatively low for the three underivatized matrices (less than 15% of loss after extraction of both free and total amino acids). This suggests that our method was not affected by the strong signal suppression due to BMAA reactivity (*i.e.*, metal adduct formation), as recently reported by Glover et al. [51] for the analysis of underivatized BMAA. Despite somewhat lower recoveries than reported elsewhere, the proposed SPE protocol seems to be very effective at cleaning cyanobacteria and mollusk matrices, while reproducibly extracting BMAA and isomers. For example, a strong matrix effect was observed for DAB in mussel matrix without the SPE clean-up step, while peak shapes and retention times were better and closer to the standards after SPE clean-up (Figure 18).

Among the internal standards that have been used, deuterated-BMAA, *i.e.*, D₃BMAA [22,25], and ⁵⁺BMAA [52] are more pertinent to accurately quantify samples by applying a corrective factor. In the absence of commercially available deuterated-BMAA (or otherwise isotopically-labeled BMAA), a group has recently validated a procedure to quantify underivatized BMAA and DAB using D₃DAB as the internal standard [24]. As a result, we chose D-2,4-diaminobutyric acid-2,3,3,4,4-²D₅ dihydrochloride (D₅DAB) as the internal standard. D₅DAB was expected to have recoveries and matrix effects similar to DAB and presumably similar to BMAA and AEG. This hypothesis was confirmed since concentrations obtained after correction with D₅DAB recovery are within a 15% error range (20% for free AEG in cyanobacteria) and not overestimated. Therefore, a corrective factor based on D₅DAB recovery could be applied to more accurately quantify BMAA and isomers in cyanobacteria, oyster and mussel matrices.

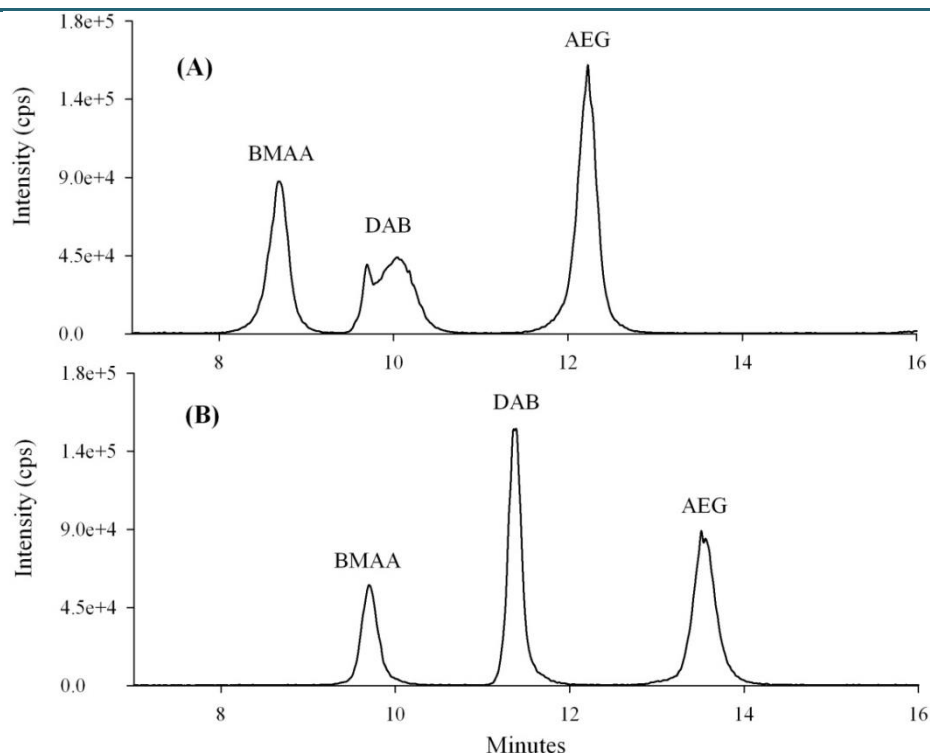


Figure 18 : the effect of the SPE clean-up on mussel matrix spiked with BMAA and AEG after extraction of free amino acids (DAB naturally present in the sample). The black line corresponds to the mass spectral transition m/z 119 > 102. (A) Spiked mussel extracted with TCA 0.1 M and injected in this solvent, while (B) the same sample subjected to PCX SPE clean-up and injected in ACN/water/FA. The shift in retention times compared to other chromatograms is due to the non-use of the guard column in (B) and due to the injection solvent, matrix effects and the non-use of a guard column in (A).

3.4.5.2. LC-MS/MS Performance: Linearity, LOD, LOQ and Repeatabilities (RT, r^2 and Ion Ratios)

The calibration curves for BMAA, DAB and AEG showed good linearity ($r^2 > 0.9996$) over the concentration range 1–500 ng/mL. However, a five-point calibration curve ranging from 1 to 100 ng/mL was classically used to quantify samples. The equations for the linear regressions were: $y = 42,414x - 6,703$ for BMAA, $y = 41,400x - 15,604$ for DAB, $y = 66,882x - 44,981$ for AEG and $y = 1,252x - 585$ for D_5 DAB.

The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration giving a signal-to-noise (S/N) ratio of three (standard deviation of noise = σ ; $S/N = 3\sigma$) for the four qualitative mass spectral transitions of BMAA and DAB. The limit of quantification (LOQ) was calculated using the general transition m/z 119 > 102. Because the area of the peak at m/z 102 was more than seven-times higher than the peaks at m/z 76 and 74, the LOQ (with $S/N > 10$, $\sigma = 3$) was defined as equal to the LOD.

The LOQ was 3 ng/mL for standards and equivalent to 15 pg on the column. The LOQs within matrices were calculated by spiking freeze-dried material subjected to the extraction of both free and total analytes, and they were 0.225 $\mu\text{g/g}$ dry weight (DW) of cyanobacteria and 0.15 $\mu\text{g/g}$ DW of shellfish. However, since no clean mollusk matrices were found (especially for DAB and BMAA after

extraction of total amino acids), LOQs for mollusks were estimated based on matrix effects. The difference of LOQs observed between cyanobacteria and mollusk matrices relied on the amount of freeze-dried material extracted (respectively, 10 and 15 mg).

While having an optimized selectivity, the instrument and method sensitivity are among the best reported for HILIC methods [19,20,22,24,45], but inferior to those reported for derivatized analytes in cyanobacterial samples [25,35]. The LOQ we obtained for cyanobacteria was better than the LOQ reported in the procedure of Combes et al. [24], possibly due to higher matrix effects in their HILIC-MS/MS method. For mollusk matrices, no LOQ of underivatized BMAA and isomers is reported. Nevertheless, LOQs of 1.7 µg/g DW and 0.15 µg/g wet weight were reported for derivatized BMAA with a gastropod [53] and a mussel matrix [54].

Thanks to an effective clean-up step and optimized gradient elution, we obtained a sensitive and selective method to quantify BMAA, DAB and AEG in cyanobacteria and mollusk matrices.

The repeatability of retention times, the correlation coefficient (r^2) and ion ratios of standards calibration curves ($n = 33$) and spiked matrices are shown in Table 12.

Even if no clean matrices were found to assess the matrix effects, the strategy adopted (see Section 3.5) allowed for the good linearity of spiked matrices. Indeed, $r^2 > 0.998$ with extraction of free amino acids and $r^2 > 0.99$ (with some exceptions) after extraction of total amino acids were observed. The lower ($r^2 \leq 0.98$) coefficient of determination for DAB (oyster and mussel) came from the natural high content of this isomer in the mollusk matrices used.

Despite the presence of a relatively low matrix effect, the retention times of analytes and the ion ratios were rather stable. The good repeatability obtained (*i.e.*, relative standard deviations less than 1% and 10% for RT and ion ratios, respectively) made this HILIC-MS/MS method suitable for the accurate quantification of BMAA and isomers in cyanobacteria and mollusk matrices, after extraction of both free and bound BMAA and its isomers.

Table 12 : retention times, correlation coefficients (r^2) and ion ratios of standards' curves and spiked cyanobacteria (*Leptolyngbya* PCC73110), oyster and mussel matrices (mean $\pm$ SD) for the extraction of free and total amino acids. For standards, the results came from 33 injections of the five-point calibration curves. For matrices, results originate from the established three-point standards' curves (3–50 ng/mL) for matrix effects injected twice (for r^2 , $n = 2$) and both matrix effects and SPE recoveries for RT and ion ratios ($n = 6$).

Samples	RT (min)				r^2				Ion Ratios (%)			
	BMAA	DAB	D ₅ DAB	AEG	BMAA	DAB	D ₅ DAB	AEG	88/102	76/102	101/102	74/102
Standards	11.25 $\pm$ 0.08	13.27 $\pm$ 0.10	13.34 $\pm$ 0.11	15.47 $\pm$ 0.11	0.9999	0.9998	0.9996	0.9996	13.1 $\pm$ 0.8	12 $\pm$ 0.8	60.3 $\pm$ 2	14.2 $\pm$ 0.8
73110^a	11.42 $\pm$ 0.05	13.39 $\pm$ 0.08	13.47 $\pm$ 0.08	15.50 $\pm$ 0.13	0.9997	0.9995	0.9995	0.9995	13.0 $\pm$ 0.1	12.0 $\pm$ 0.4	58.8 $\pm$ 2	14.7 $\pm$ 1
73110^b	11.12 $\pm$ 0.04	13.03 $\pm$ 0.04	13.08 $\pm$ 0.04	15.17 $\pm$ 0.09	0.9998	0.9973	0.9992	0.9990	12.6 $\pm$ 1	11.5 $\pm$ 1	58.9 $\pm$ 4	14.3 $\pm$ 1
Oyster^a	11.42 $\pm$ 0.05	13.41 $\pm$ 0.06	13.44 $\pm$ 0.07	15.55 $\pm$ 0.06	0.9999	0.9991	0.9997	0.9993	12.4 $\pm$ 1	11.3 $\pm$ 1	58.6 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0.4
Oyster^b	11.06 $\pm$ 0.04	12.82 $\pm$ 0.09	12.88 $\pm$ 0.10	15.08 $\pm$ 0.14	0.9986	0.9807	0.9993	0.9915	12.0 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.4	58.4 $\pm$ 2	14.4 $\pm$ 0.6
Mussel^a	11.30 $\pm$ 0.07	13.14 $\pm$ 0.07	13.17 $\pm$ 0.07	15.46 $\pm$ 0.11	0.9997	0.9983	0.9996	0.9995	12.8 $\pm$ 0.9	11.5 $\pm$ 0.9	59.4 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.3
Mussel^b	10.91 $\pm$ 0.03	12.53 $\pm$ 0.05	12.53 $\pm$ 0.05	15.14 $\pm$ 0.11	0.9975	0.9498	0.9990	0.9919	12.0 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.4	58.5 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.4

RT, retention time; a samples spiked after extraction of free amino acids; b samples spiked after extraction of total amino acids.

3.4.6. Screening of BMAA and Isomers in Cyanobacteria

3.4.6.1. Kinetics of Growth and Production of BMAA and Isomers

As the production of BMAA by cyanobacteria has been suggested to be “a function of growth condition and/or life cycle stages” [7], the kinetics of growth and toxin production in batch cultures were made with two non-axenic strains that had previously been reported to produce BMAA: *Leptolyngbya* PCC 73110 [12,25] and *Nostoc* CCMP 2511 [36]. The *Nostoc* strain was reported to produce BMAA by methods lacking in selectivity (e.g., FLD), while *Leptolyngbya* was recently quantified with a highly selective MS/MS method. Biomass was regularly monitored, and cells were harvested between seven to 111 days of growth. The extraction of free analytes was performed on all samples, while the extraction of free plus bound (= total) analytes was carried out when freeze-dried material was available (Day 13 for both *Nostoc* CCMP 2511 and Day 40 for *Leptolyngbya* PCC73110 (Figure 19).

Neither free nor bound BMAA were found in any of the two strains, at any time of the growth curve. However, these strains are known to be BMAA producers, and the reported concentrations are above our LOQ [25,36]. For the *Nostoc* strain, the use of a non-selective method could have led to

misidentification and/or overestimation of BMAA in previous studies [18]. Nevertheless, Jiang et al. have reported 0.73 $\mu\text{g/g}$ DW of BMAA in the *Leptolyngbya* PCC73110 thanks to a highly selective and validated MS/MS method involving the derivatization of samples [25]. The conditions of the culture that we and their group applied are really close [12], and the selectivity of both methods drastically reduces the risk of misidentification. It should be noted that this group had performed a total extraction of BMAA after six days of growth, while we could only perform total extraction after 40 days of growth (due to limited freeze-dried material).

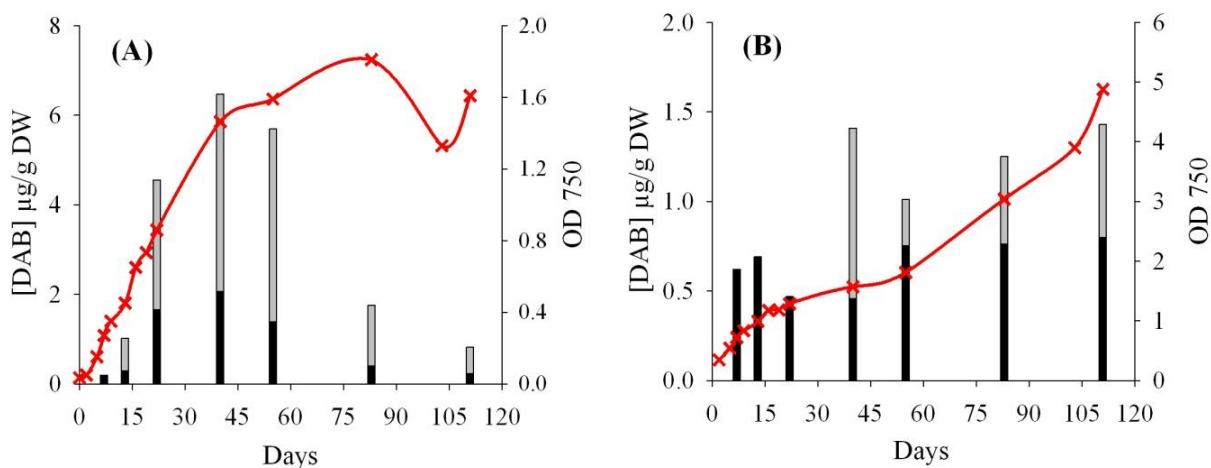


Figure 19 : growth curves (red line, cross symbols) and free (dark histograms) and bound (grey histograms) DAB concentration for (A) *Nostoc* CCMP 2511 and (B) *Leptolyngbya* PCC 73110.

The fact that “cyanobacteria in culture display a fluctuating BMAA production”, as suggested by this same group [30], may explain why we could not find BMAA in our *Leptolyngbya* culture, if the production is highly variable. Further trials were made with this strain using different sources of nitrogen in the culture medium and different culture durations; however, BMAA was never found in our work, while AEG was sometimes detected (data not shown).

Interestingly DAB, a possible neurotoxic isomer of BMAA [23], was detected in all samples analyzed. As observed for BMAA [7], no correlation between the free and bound form of DAB was observed, but the bound form seemed to be more important. For example, free DAB from LOQ to 2 $\mu\text{g/g}$ was reported for CCMP 2511, while the total form ranged from 0.82 to 5.8 $\mu\text{g/g}$ DW. The kinetic of DAB production (both free and bound) by CCMP 2511 seemed to follow the kinetics of growth (Figure 19A). On the contrary, DAB production by the other strain seemed more stable and independent of growth. The two kinetics of DAB production were different, and the concentrations found varied by up to one

order of magnitude; however, DAB was always detected in these two strains during the kinetic experiment.

3.4.6.2. Screening of Others Lab-Cultured Cyanobacteria

We screened eight other cyanobacterial strains for the production of BMAA and isomers (Table 13). Unlike Banack et al. [28], we could not find AEG in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Nostoc* PCC 7120 extracts, but trace levels (from LOD to 1.5 µg/g DW of total AEG) were sometimes found in *Leptolyngbya* PCC 73110, *Synechococcus elongatus* CCAP1479/1B and *Nostoc endophytum* CCAP1453/14 (data not shown).

Besides the three strains above, four more cyanobacteria were screened, as they had been previously reported to produce BMAA by the non-highly selective FLD [7] or selective MS/MS method with derivatization [29]. Finally, more than 60 samples corresponding to ten strains were analyzed with the HILIC-MS/MS method that we have optimized. No BMAA was found, while at least trace amounts of DAB were observed in all samples (except for PCC6803). The lack of selectivity of FLD is now well admitted, so the high concentrations of BMAA [7] reported with this detection technique cannot be fully considered. However, DAB production by cyanobacteria had already been reported, in *Calothrix* (<50 µg/g) in 2008 [22], then in 16 cyanobacterial samples (<0.83 µg/g) in 2010 [20] and in trace amounts in 2012 [45].

In these cases, HILIC methods were used, but DAB was also observed after derivatization of *Leptolyngbya* PCC73110 [12]. Once again, the bound form of DAB seemed to predominate. The concentrations we obtained here for DAB varied by a factor of 10 to 15 within the same strain, yet they still were within the concentration ranges reported before.

Krüger et al. [17] have raised a possible substance conversion into DAB during the hydrolysis of the sample preparation procedure, but we did detect free DAB with our procedure to extract free amino acids in which no acid hydrolysis of the samples was performed.

Little is known about BMAA and DAB production by cyanobacteria. The only work focusing on the factors that influence BMAA production showed that nitrogen starvation resulted in the production of BMAA [55]. However, the methodological approach and conclusion of this study were subsequently criticized [18]. This same group has recently reaffirmed a link between the content of BMAA and nitrogen availability in a field study of cyanobacterial blooms [56]. They have also suggested that “at high nitrogen level (>40 µM), BMAA production is suppressed” [56].

Table 13 : the content of free and total DAB ($\mu\text{g/g DW}$) in ten strains of cyanobacteria. When more than one discrete sample was screened (different medium of culture or days of growth), the minimum and the maximum concentrations are reported.

Cyanobacterial Strain	Free DAB ($\mu\text{g/g DW}$)	Total DAB ($\mu\text{g/g DW}$)
<i>Leptolyngbya</i> PCC 73110 ^a	<LOD–2.69	1.01–1.57
<i>Nostoc</i> CCMP 2511/ CMMED01 ^a	<LOD–2.27	0.82–12.48
<i>Microcystis</i> PCC 7806 ^a	<LOD	<LOD
<i>Nostoc</i> PCC 7120 ^a	<LOD	*
<i>Nostoc</i> PCC 7107 ^a	2.12–7.2	*
<i>Symploca</i> PCC 8002 ^a	0.3	0.43
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<LOD	<LOD
<i>Synechococcus elongatus</i> CCAP1479/1B	0.23–2.71	0.4–3.52
<i>Calothrix crustacea</i> CCAP1410/9	0.6–0.92	6.95–14.53
<i>Nostoc endophytum</i> CCAP1453/14	0.34–0.55	6.78–7.52

* Not analyzed for total DAB; <LOD, a peak corresponding to the transition 119 > 102 was detected at a retention time close to D₅DAB, but was not quantifiable (<0.225 $\mu\text{g/g}$); a strain reported to be a BMAA producer.

However, this is not confirmed by the publication of Jiang et al. [25] in which BMAA was reported in lab-cultured *Leptolyngbya* PCC 73110 grown in BG11 (Blue-Green 11) medium that contains a very high nitrate concentration. We also could not confirm this hypothesis with our lab-cultured cyanobacteria. Indeed, we grew cultures of *Nostoc* CCMP 2511 and *Leptolyngbya* PCC 73110 in media without any nitrogen source and did not observe the appearance of BMAA production in those strains that had been reported to produce BMAA before.

Now, highly selective methods exist, with and without a derivatization step [24,25], so the ability of cyanobacteria to produce BMAA and the factors controlling this production can be effectively assessed. In this attempt, only two strains (*i.e.* *Leptolyngbya* PCC73110 and *Nostoc* PCC7120) were confirmed to contain BMAA after derivatization of samples [25,29]. However, we could not find BMAA in these two strains with our selective HILIC-MS/MS method, maybe due to different conditions of culture [45], or because of the supposed brief nature of BMAA production by cyanobacteria [30], or due to the lack of sensitivity of our method. Nevertheless, we did detect DAB in almost all samples and sometimes AEG, which stresses the requirement of highly selective methods to accurately quantify BMAA in cyanobacteria.

3.4.7. Screening of Mollusks of Thau Lagoon

Since the discovery of BMAA in 1967, the link between BMAA and neurodegenerative diseases, like amyotrophic lateral sclerosis (ALS), is still under debate [3,57,58]. The consumption of contaminated aquatic organisms/seafood is a possible pathway of human exposure to BMAA. Potential associations of

BMAA found in aquatic organisms with sporadic ALS were recently hypothesized in Chesapeake Bay, Maryland, USA [59], and in Thau Lagoon, France [35], with methods using the derivatization of analytes.

We decided to screen BMAA and isomers in mollusks collected in the Thau Lagoon during summer, 2009, with the HILIC-MS/MS that we have developed.

The three isomers, BMAA, DAB and AEG, were found in mussels and oysters of this bivalve farming area (Figure 20). The samples were freeze-dried and stored at room temperature since 2009.

While both free BMAA and AEG were detected only up to July 1 (in six out of 19 samples for BMAA and in three of 19 samples for AEG), free DAB was always observed. However, after acid hydrolysis, all isomers were detected and quantified at higher concentrations. The concentrations of total BMAA in mussels showed a time-dependent increase during the summer of 2009, while they were more stable in oyster. The concentrations of total DAB were similar in the two mollusk matrices, between 3.4–9.7 and 3.3–8.8 µg/g DW in mussel and oyster, respectively. As for BMAA, the concentrations of total AEG in mussels increased between 20 June and 7 September. The higher content of BMAA and isomers found in mussels may be explained by their generally higher filtration activity compared to oysters [35].

During the summer, 2009, two phytoplankton blooms dominated by diatoms (e.g., *Chaetoceros* sp.) were observed at the beginning of July and at the end of August in the Thau Lagoon [60]. As diatoms were recently suggested to produce BMAA [30], the occurrence of such microalgae in addition to picocyanobacteria [35] could explain the presence of BMAA in mollusks during the summer, 2009. However, the production of BMAA by microalgae of the Thau Lagoon has not been studied so far.

As no uncontaminated mussel or oyster samples could be found in the study area, we decided to spike the analytes into extracts of naturally contaminated samples. This exercise has allowed for the verification of retention times and ion ratios. No differences in retention time or ion ratios were detected between naturally-contaminated and spiked samples (Figure 21). It should be noted that after acid hydrolysis, an interfering compound giving a signal at the transition m/z 119 > 102 (corresponding to the loss of the NH_3 group [20]) and eluting just before BMAA was observed for mollusk matrices (Figure 21). This unknown interference always eluted before BMAA, and the retention times of both compounds were reproducible. For example, mean retention times of 10.62 min $\pm$ 0.04 and 10.90 min $\pm$ 0.04, respectively, for the interference and BMAA in mussel matrix were obtained for seven replicates of the same sample injected twice and one replicate of four other mussel samples.

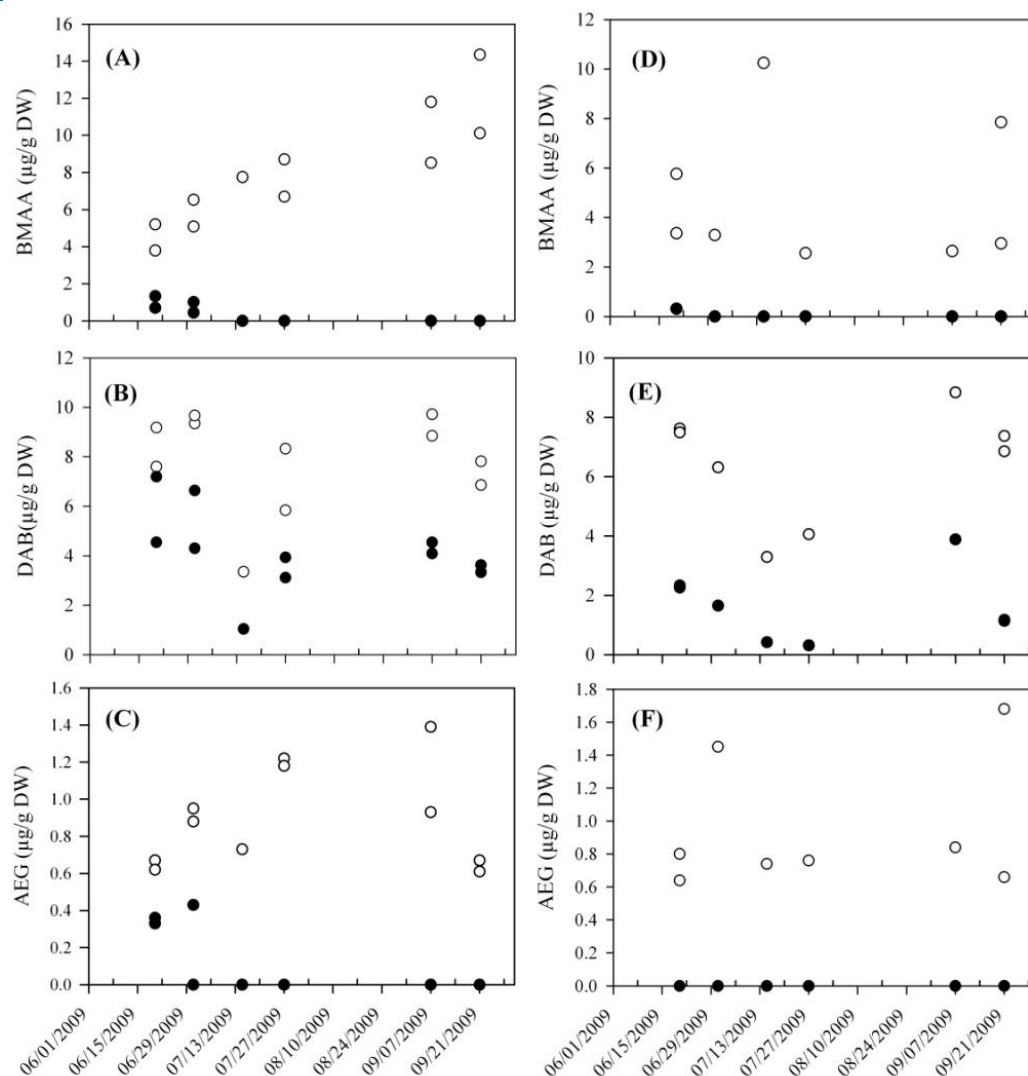


Figure 20 : (A–C) BMAA, DAB and AEG concentrations in free (black circles) and total form (empty circles) in mussels collected in 2009 and (D–F) in oysters. Mollusks were sampled in two of the three areas where shellfish were cultured in the lagoon and analyzed for both areas when material was available.

Similarly, an interfering compound, partially resolved from BMAA, was reported by Jiang et al. [27] for cyanobacteria and mollusks from the Baltic Sea, after the derivatization of analytes. Nevertheless, retention time, specific mass spectral transitions (m/z 119 to m/z 88 and 76) and ion ratios (88/119 and 76/119) allowed us to unambiguously identify BMAA in hydrolyzed mollusk matrices. Moreover, the chromatograms of spiked oyster and mussel matrix clearly showed that the areas of mass spectral transitions corresponding to BMAA (and other isomers) are higher than in the non-spiked samples (Figure 21), thereby confirming that BMAA, DAB and AEG were present in these matrices. This compound could potentially interfere with the quantification of BMAA. However, as no interfering compound was detected with the mass spectral transitions m/z 119 to m/z 88 and 76, we quantified

BMAA in parallel using either the highest transition (which has the interfering compound eluting at the front) or the two specific smaller transitions, and the concentrations obtained with either calculation method were within an error range of 10–15%. As this error is in the range of the overall method variability, we decided to report quantification with the same transition as for the other isomers for the purpose of consistency.

The presence of BMAA isomers (DAB and AEG in this study plus BAMA in another study [27]) and interfering compounds within the same samples demonstrates the need for highly selective methods to accurately quantify those molecules in biological matrices.

Our results confirmed the presence of BMAA and isomers in mollusks of the Thau Lagoon, but with a HILIC-MS/MS method without the derivatization of samples. The concentrations we obtained here are similar to those that Masseret et al. have reported [35] for total BMAA in mussels, but higher for total DAB in mussels and both total BMAA and DAB in oysters. However, the application of a corrective factor is not mentioned in their study.

Apart from Thau Lagoon, BMAA and isomers were also reported in other ecosystems, after the derivatization of samples. If we consider the most selective methods that have been employed, BMAA was severally detected in mollusks coming from the Baltic Sea [12], in mussels and oysters either in very low [13] or at similar concentrations than what we obtained (0.27–1.16 µg/g wet weight corresponding to about 1.3–5.8 µg/g DW of mussel, if wet mussels are assumed to contain 80% water [54]). BMAA was also reported in oysters originating from the southeastern United States (6.8–46.9 µg/g DW) [53], in mollusks of Lake Taihu, China (mean of 3.21 µg/g DW) [15] and in cockles collected on Portuguese coasts (up to 0.434 µg/g DW) [32]. Finally, the presence of BMAA in mollusks of South Florida waters should be considered despite the use of a non-selective LC-FLD method [14].

Concerning BMAA isomers, BAMA and DAB in Swedish oysters [12,27], DAB in blue crabs [59] and DAB and AEG in Portuguese cockles [32] were observed. Interestingly, Lage et al. [32] mentioned that “these two isomers were observed along with BMAA in nearly all samples”.

Masseret et al. [35] also found both BMAA and DAB in all mollusks samples of the Thau Lagoon. When BMAA isomers are considered, they are frequently detected in filter-feeding shellfish mollusk matrices. Recently, they were also reported in shark cartilage dietary supplements with both the FLD and MS/MS detection methods after the derivatization of samples [61].

Nevertheless, as far as we know, this is the first time that BMAA and isomers have been reported in mollusk matrices without the derivatization of samples, suggesting that HILIC-MS/MS methods are suitable to quantify these analytes in complex matrices.

While BMAA toxicity has been well studied [2] and DAB was reported to be a neurotoxic non-proteinogenic amino acid [62], the toxicity of AEG is unknown [25]. The incorporation of BMAA into proteins remains to be “indisputably proven” [63], especially because it is suggested to be involved in BMAA bioaccumulation [5]. Further work is required to understand the bioaccumulation pathway of BMAA in higher trophic levels of ecosystems, as observed in Guam or in the Baltic Sea.

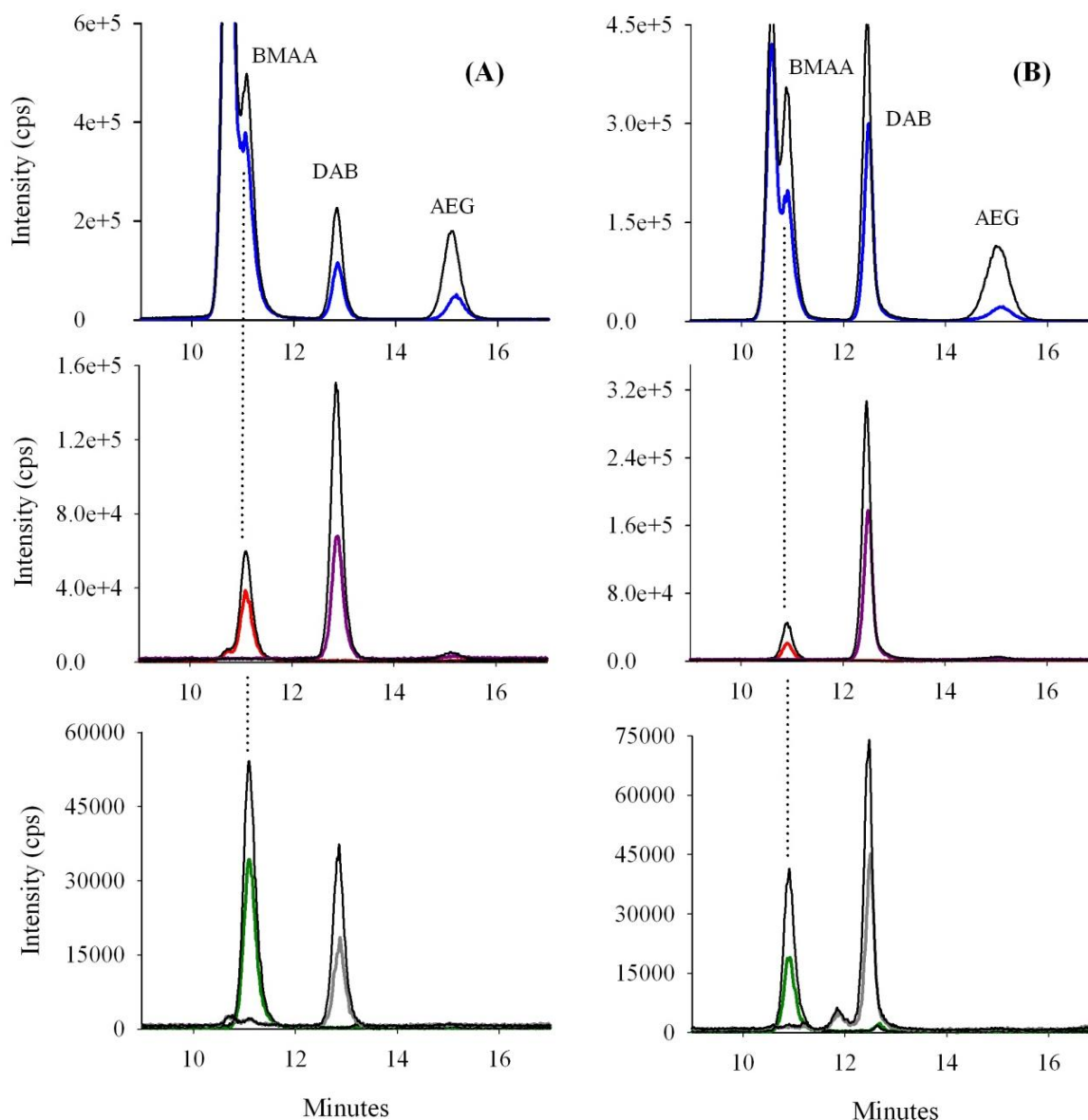


Figure 21 : chromatograms of spiked (dark line) and non-spiked, naturally-contaminated (A) oyster and (B) mussel samples after performing the extraction for the determination of total BMAA and isomers. Colored lines represent mass spectral transitions m/z 119 to m/z 102 (blue, top graphs), 88 (red) and 101 (purple) in the middle graphs and 76 (green) and 74 (grey) in the bottom graphs.

3.5. Experimental Section

3.5.1. Chemicals and Reagents

β -N-methylamino-L-alanine hydrochloride (BMAA, B107) and trichloroacetic acid (TCA, 33731) were purchased from Sigma-Aldrich, France, while N-2-aminoethylglycine (AEG, A1153) and 2,4-diaminobutyric acid dihydrochloride (DAB, D0083) were obtained from TCI, Belgium. D-2,4-diaminobutyric acid-2,3,3,4,4-2D5 dihydrochloride (D₅DAB), used as the internal standard, was purchased from CDN isotopes (CIL, Sainte-Foy-La-Grande, France).

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained as HPLC grade solvents from JT Baker. Water for analysis was supplied by a Milli-Q integral 3 system (Millipore). Solutions of formic acid (FA, 33015), hydrochloric acid 37% (HCl, 258148) and ammonium hydroxide (221228), all reagent grade, were purchased from Sigma-Aldrich.

Calibrant stock solutions (10 μ g/mL) of BMAA, DAB, AEG and D₅DAB were prepared in Milli-Q water and stored at 4 °C. As observed by Combes et al., 2013 [24], no degradation of stock solutions was observed after more than 6 months in this storage condition.

3.5.2. Samples

3.5.2.1. Cultures of Cyanobacteria

Ten non-axenic species of cyanobacteria, six of which are reported to be BMAA producers, were cultured for the screening of BMAA and isomers. *Leptolyngbya* PCC 73110 and *Synechocystis* PCC 6803 were maintained in BG11 medium [64]. *Nostoc* PCC 7120 and PCC 7107 were cultured in BG11₀ (nitrogen free). *Microcystis* PCC 7806 was cultured in modified BG11, BG110 with the addition of 2 mM NaNO₃ and 10 mM NaHCO₃, and *Symploca* PCC 8002 in a mixture of BG11 and modified L1 medium, salinity adjusted to 27, no vitamins added (1:12, v/v). *Nostoc* CCMP 2511 was cultured in modified L1 medium, with four-times the classic NaNO₃ concentration of L1 medium [65]. *Synechococcus elongatus* CCAP1479/1B was grown in Conway 10%, seawater diluted 3.33-times with Milli-Q water before adding the Conway elements [66] without silica. *Calothrix crustacea* CCAP1410/9 was cultured in F/2 medium [67] and *Nostoc endophyllum* CCAP1453/14 in Conway medium (without silica).

The Milli-Q water used to prepare BG11 and modified BG11 medium was supplied by a Milli-Q integral 3 system (Millipore, Saint-Quentin-Yvelines, France), while filter-sterilized seawater at a salinity of 35 was used for seawater culture media. All cultures were maintained under sterile conditions at 22 °C

under a 16:8 h light/dark cycle at a light intensity of 50–60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, except *Synechococcus elongatus*, *Calothrix crustacean* and *Nostoc endophytum* (20 °C, 12:12 h light/dark cycle, light intensity of 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Batch cultures were grown to establish growth factors and toxin production for the strains *Leptolyngbya* PCC 73110 and *Nostoc* CCMP 2511. Biomass was regularly monitored by the measure of DO750 nm (Jenway spectrophotometer 6705 series), and cyanobacteria were sampled after a growth period of 7, 13, 22, 40, 55, 83 and 111 days. All other strains were maintained in batch culture. Cyanobacterial cells were harvested via centrifugation at 4,000× g for 30 min at 4 °C. The supernatant was carefully discarded, and the resulting pellet was freeze-dried, homogenized and stored at room temperature until further processing.

3.5.2.2. Collection of Field Samples

During summer, 2009, mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Crassostrea gigas*) were sampled in the Mediterranean Lagoon of Thau, France, from two sites (Bouzigues and Marseillan; see Pernet et al. [60]). Whole flesh aliquots were freeze-dried, stored at room temperature and homogenized with a Microtron MB 550™ blender (Kinematica) before extraction.

3.5.3. Sample Preparation

3.5.3.1. Extraction

Aliquots of freeze-dried material (10 mg for cyanobacteria and 15 mg for mollusks) were weighted in a 1.5 mL Eppendorf® tube, and both 0.5 g of 200 μm glass beads and 750 μL of trichloroacetic acid (TCA) 0.1 M were added. Extraction was performed with a mixer mill (Retsch MM400, Germany) for 30 min at 30 Hz. Deuterated DAB (D_5DAB , concentrations of 30 or 50 ng/mL for the extraction of free and total analytes) was added before extraction as an internal standard. Tubes were centrifuged at 13,000× g after grinding to precipitate beads and debris.

For the extraction of free BMAA and isomers, the supernatant was collected and filtered through a 0.22- μm filter (Nanosep® MF, Pall, Mexico) to remove particulate material. The volume was adjusted to 1 mL with TCA 0.1 M before SPE clean-up.

For the extraction of total analytes, the supernatant was collected after grinding and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in 600 μL HCl 6 M. Acid hydrolysis was performed in a Thermomixer® comfort (Eppendorf, Fisher Scientific, Illkirch, France) for 24 h at 99 °C to release the bound form of BMAA and isomers from proteins. HCl was dried under a stream of nitrogen, and the residue was dissolved in 1 mL of TCA 0.1 M before SPE clean-up.

3.5.3.2. SPE Clean-Up

Two kinds of polymeric cation-exchange sorbents (60 mg/3cc cartridges), Bond Elut® Plexa PCX (Agilent Technologies, VWR, France) and Oasis® MCX (Waters, France), were compared with the recoveries of standards. Then, SPE clean-up with the Plexa PCX cartridge was carried out according to Combes et al. [24] with some modifications. The mixed-mode sorbents were conditioned with 2 mL of methanol (MeOH) followed by 1 mL of TCA 0.1 M. Then, 1 mL of sample was loaded onto the cartridge, which was consecutively rinsed with 1 mL of HCl 0.1 M and 2 mL of MeOH. After allowing the cartridges to dry, analytes were eluted with 3 + 1 mL of MeOH/NH₄OH (93:7, v/v). The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40 °C. Finally, the residue was dissolved in a mixture of ACN/water (63:37, v/v), both containing 0.1% FA, before injection.

3.5.4. Analysis by LC-MS/MS

Analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was performed on a Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) (model Nexera, Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (5500 QTRAP, AB Sciex). Chromatography was performed with a ZIC®-HILIC column (150 × 2.1 mm, 5 µm, Merck Sequant®, Fontenay-sous-Bois, France) and a TSK gel amide 80 guard column (2 × 10 mm, 5 µm).

Mobile phases were Milli-Q water (Mobile Phase A) and ACN (Mobile Phase B), both containing 0.1% formic acid. The flow rate was 0.2 mL/min, and the injection volume was 5 µL. The column temperature was 30 °C, while samples were kept at 4 °C. The linear gradient elution started with 37% of Mobile Phase A, rising to 55% over 18 min, held for 2 min, then decreased to 37% of Mobile Phase A for 3 min and held for 15 min to equilibrate the system. In order to reduce the quantity of impurities entering the MS system, the flow of the first five minutes was directed to the waste container.

To optimize the chromatographic resolution of BMAA and its isomers, a gradient elution was developed thanks to a 23 factorial design. Resolution was calculated as $R_s = 2(R_{tB} - R_{tA}) / (w_B + w_A)$ with R_t the retention time and w the width at the base of the common mass spectral transition m/z 119 > 102. Results were analyzed and interpreted using STATGRAPHICS Centurion XV software.

The LC-MS/MS system was used in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) detection. The most intense and common transition m/z 119 > 102 was used to quantify BMAA, DAB and AEG, while the transition m/z 124 > 47 was used to quantify D₅DAB, because the other transitions (e.g., m/z 124 > 106) suffered from a high background signal.

To increase selectivity, two specific mass spectral transitions of BMAA (m/z 119 > 88 and 119 > 76) and DAB (m/z 119 > 101 and 119 > 74) and the ion ratios 88/102 and 76/102 for BMAA and 101/102 and 74/102 for DAB were also monitored. A sample was considered positive if the specific transitions were detectable and the variability of ion ratios observed in samples was less than 20%. Classically, the accepted variability is between 10% and 20% for ratios of this height of order. As we observed differences of less 10% for all analytes, we obtained an acceptable variability of ion ratios between standards and samples.

The ESI interface was operated using the following parameters: curtain gas 20 psi; temperature 600 °C; Gas 1 40 psi; Gas 2 60 psi; ion spray voltage 5500 V. For detection, the parameters are reported in Table 14.

BMAA and isomers were quantified using a five-point calibration curve of pure standards constructed by dilution series (1–100 ng/mL) of stock solutions in a mixture of ACN and water (63:37, v/v, both containing 0.1% FA). A corrective factor derived from D₅DAB recovery was applied to quantify more accurately BMAA, DAB and AEG. The software Analyst 1.5.1 was used to analyze the acquired data.

Table 14 : parameters used for optimal detection of BMAA and isomers with the 5500 QTRAP mass spectrometer.

Transition (m/z)	EP (V)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
119 > 102	10	81	13	12
124 > 47		71	21	22
119 > 88		66	17	10
119 > 76		66	17	10
119 > 101		86	11	8
119 > 74		86	19	8

EP, entrance potential; DP, declustering potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential.

3.5.5. Recoveries and Matrix Effects

Recoveries of the SPE clean-up step and remaining matrix effects were estimated with one cyanobacterial and two shellfish matrices after extraction of both free and total BMAA and isomers. It has to be noted that no clean matrices were found (particularly after acid hydrolysis). As a compromise, a naturally-contaminated matrix was analyzed in parallel with and without spiking, and the peak areas of the non-spiked samples were subtracted from the peak areas of the spiked samples.

The *Leptolyngbya* PCC73110 (grown 40 days in conditions reported in Subsection 3.2.1) was chosen as the cyanobacterial matrix. The two shellfish matrices, mussel (*M. galloprovincialis*) and oyster (*C. gigas*), were sampled in 2009 in the Thau Lagoon where BMAA and DAB had been reported [35].

Recoveries of the SPE clean-up protocol with the Plexa PCX cartridge were evaluated with these three matrices with the extraction of both free and total analytes (see Subsection 2.2.1). Matrices were spiked in triplicate just before SPE with a mixture of BMAA and isomers at a final concentration of 30 ng/mL.

The remaining matrix effects were also assessed for both free and total extraction procedures. Before injection, the dried matrices subjected to extraction procedures were dissolved in a spiked ACN/water mixture to establish three-point standard curves (3, 10, 50 ng/mL). The slope of the spiked matrix curves was compared to the slope of standard curves in solvent to estimate the matrix effects.

3.5.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out with SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

3.6. Conclusions

We present here a highly selective HILIC-MS/MS method to confidently identify and accurately quantify underivatized BMAA and isomers (DAB and AEG) in cyanobacterial and shellfish samples, in both free and total form. Thanks to an optimized gradient elution and an effective SPE clean-up step, good sensitivity (LOQ of 0.22 and 0.15 µg/g DW for cyanobacteria and mollusks, respectively) and low matrix effects were obtained. The use of D₅DAB as the internal standard allowed for correction and accurate quantification of BMAA and isomers in all samples.

This reliable method was applied to screen ten species of cyanobacteria. Neither free nor bound BMAA were found in our cultures. Nevertheless, DAB, a neurotoxic isomer of BMAA, was commonly detected. The HILIC-MS/MS method was also used to screen mollusks collected in 2009 in the Thau Lagoon.

BMAA was identified in all shellfish samples after acid hydrolysis, and the concentrations of total BMAA were similar to those reported by Masseret *et al.* [35] in mussels. Additionally, we identified free BMAA in some samples during the month of June, 2009; however, no free BMAA was detected in either mussels or oysters after July 1, 2009. The significance of the general occurrence of DAB and to a lesser extent AEG in different matrices (cyanobacteria and mollusks) should be assessed further. Research is currently underway in our laboratory to pinpoint phytoplankton organisms producing BMAA in the Thau Lagoon. Furthermore, we intend to study the spatio-temporal distribution of BMAA and isomers over a longer time period and in other areas to provide data for risk evaluation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out under the RISALTOX project (Ifremer) and co-funded by the Regional Council of the "Pays de la Loire". The authors would like to thank all of the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study.

Bibliography

- Vega, A.; Bell, E.A. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 759–762.
- Chiu, A.S.; Gehringer, M.M.; Welch, J.H.; Neilan, B.A. Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, *8*, 3728–3746.
- Karamyan, V.T.; Speth, R.C. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sci.* **2008**, *82*, 233–246.
- Cox, P.A.; Banack, S.A.; Murch, S.J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13380–13383.
- Murch, S.J.; Cox, P.A.; Banack, S.A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12228–12231.
- Murch, S.J.; Cox, P.A.; Banack, S.A.; Steele, J.C.; Sacks, O.W. Occurrence of β -methylamino α -L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* **2004**, *110*, 267–269.
- Cox, P.A.; Banack, S.A.; Murch, S.J.; Rasmussen, U.; Tien, G.; Bidigare, R.R.; Metcalf, J.S.; Morrison, L.F.; Codd, G.A.; Bergman, B. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5074–5078.
- Metcalf, J.S.; Banack, S.A.; Lindsay, J.; Morrison, L.F.; Cox, P.A.; Codd, G.A. Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 702–708.
- Esterhuizen, M.; Downing, T.G. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2008**, *71*, 309–313.
- Johnson, H.E.; King, S.R.; Banack, S.A.; Webster, C.; Callanaupa, W.J.; Cox, P.A. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *118*, 159–165.
- Li, A.; Tian, Z.; Li, J.; Yu, R.; Banack, S.A.; Wang, Z. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* **2010**, *55*, 947–953.
- Spáčil, Z.; Eriksson, J.; Jonasson, S.; Rasmussen, U.; Ilag, L.L.; Bergman, B. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst* **2010**, *135*, 127–132.
- Jonasson, S.; Eriksson, J.; Berntzon, L.; Spáčil, Z.; Ilag, L.L.; Ronnevi, L.-O.; Rasmussen, U.; Bergman, B. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9252–9257.
- Brand, L.E.; Pablo, J.; Compton, A.; Hammerschlag, N.; Mash, D.C. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 620–635.
- Jiao, Y.; Chen, Q.; Chen, X.; Wang, X.; Liao, X.; Jiang, L.; Wu, J.; Yang, L. Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin beta-methylamino-L-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk. *Sci. Total Environ.* **2014**, *468*, 457–463.
- Pablo, J.; Banack, S.A.; Cox, P.A.; Johnson, T.E.; Papapetropoulos, S.; Bradley, W.G.; Buck, A.; Mash, D.C. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* **2009**, *120*, 216–225.
- Kruger, T.; Oelmüller, R.; Lucas, B. The origin of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA): Cycads and/or cyanobacteria? *J. Endocytobiosis Cell Res.* **2012**, *22*, 29–36.
- Faassen, E.J. Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: What do we really know? *Toxins* **2014**, *6*, 1109–1138.
- Faassen, E.J.; Gillissen, F.; Lüring, M. A Comparative Study on Three Analytical Methods for the

- Determination of the Neurotoxin BMAA in Cyanobacteria. *PLoS One* **2012**, 7, e36667.
20. Krüger, T.; Mönch, B.; Oppenhäuser, S.; Luckas, B. 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* **2010**, 55, 547–557.
21. Kubo, T.; Kato, N.; Hosoya, K.; Kaya, K. Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon* **2008**, 51, 1264–1268.
22. Rosen, J.; Hellenas, K.E. 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* **2008**, 133, 1785–1789.
23. Banack, S.A.; Downing, T.G.; Spáčil, Z.; Purdie, E.L.; Metcalf, J.S.; Downing, S.; Esterhuizen, M.; Codd, G.A.; Cox, P.A. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB). *Toxicon* **2010**, 56, 868–879.
24. Combes, A.; El Abdellaoui, S.; Sarazin, C.; Vial, J.; Mejean, A.; Ploux, O.; Pichon, V.; Group, B. Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin β -N-methyl amino-L-alanine in complex environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 771, 42–49.
25. Jiang, L.; Johnston, E.; Åberg, K.M.; Nilsson, U.; Ilag, L. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 1283–1292.
26. Banack, S.A.; Metcalf, J.S.; Spacil, Z.; Downing, T.G.; Downing, S.; Long, A.; Nunn, P.B.; Cox, P.A. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon* **2011**, 57, 730–738.
27. Jiang, L.; Aigret, B.; Borggraeve, W.; Spacil, Z.; Ilag, L. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 1719–1730.
28. Banack, S.A.; Metcalf, J.S.; Jiang, L.; Craighead, D.; Ilag, L.L.; Cox, P.A. Cyanobacteria produce N-(2-aminoethyl) glycine, a backbone for peptide nucleic acids which may have been the first genetic molecules for life on Earth. *PLoS One* **2012**, 7, e49043–e49043.
29. Berntzon, L.; Erasmie, S.; Celepli, N.; Eriksson, J.; Rasmussen, U.; Bergman, B. BMAA Inhibits Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Mar. Drugs* **2013**, 11, 3091–3108.
30. Jiang, L.; Eriksson, J.; Lage, S.; Jonasson, S.; Shams, S.; Mehine, M.; Ilag, L.L.; Rasmussen, U. Diatoms: A novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic environments. *PLoS One* **2014**, 9, e84578.
31. Jiang, L.; Ilag, L.L. Detection of endogenous BMAA in dinoflagellate (*Heterocapsa triquetra*) hints at evolutionary conservation and environmental concern. *PubRaw Sci.* **2014**, 1, 1–8.
32. Lage, S.; Costa, P.R.; Moita, T.; Eriksson, J.; Rasmussen, U.; Rydberg, S.J. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquat. Toxicol.* **2014**, 152, 131–138.
33. Dunlop, R.A.; Cox, P.A.; Banack, S.A.; Rodgers, K.J. The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS One* **2013**, 8, e75376.
34. Cohen, S.A. Analytical techniques for the detection of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Analyst* **2012**, 137, 1991–2005.
35. Masseret, E.; Banack, S.; Boumédiène, F.; Abadie, E.; Brient, L.; Pernet, F.; Juntas-Morales, R.; Pageot, N.; Metcalf, J.; Cox, P.; et al. The French Network on A.L.S.: Investigation, dietary bmaa exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from Southern France. *PLoS One* **2013**, 8, e83406.
36. Banack, S.; Johnson, H.; Cheng, R.; Cox, P. Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium. *Mar. Drugs* **2007**, 5, 180–196.
37. Eriksson, J.; Jonasson, S.; Papaefthimiou, D.; Rasmussen, U.; Bergman, B. Improving derivatization efficiency of BMAA utilizing AccQ-Tag® in a complex cyanobacterial matrix. *Amino Acids* **2009**, 36, 43–48.

38. Lawrenz, E.; Fedewa, E.; Richardson, T. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 865–871.
39. Serive, B.; Kaas, R.; Berard, J.-B.; Pasquet, V.; Picot, L.; Cadoret, J.-P. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Bioresource Technol.* **2012**, *124*, 311–320.
40. Ravn, H.; Anthoni, U.; Christophersen, C.; Nielsen, P.H.; Oshima, Y. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* **1995**, *7*, 589–594.
41. Zengdong, Z.; Herrenknecht, C.; Abadie, E.; Brissard, C.; Tixier, C.; Mondegue, F.; Séchet, V.; Amzil, Z.; Hess, P. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon* **2014**, doi:10.1016/j.toxicon.2014.03.010.
42. Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D.M.; Lu, Z.; Mazzeo, J.R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J. Chromatogr. B* **2007**, *852*, 22–34.
43. Gerssen, A.; McElhinney, M.A.; Mulder, P.P.J.; Bire, R.; Hess, P.; de Boer, J. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1213–1226.
44. Kilcoyne, J.; Fux, E. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7123–7130.
45. Li, A.F.; Fan, H.; Ma, F.F.; McCarron, P.; Thomas, K.; Tang, X.H.; Quilliam, M.A. Elucidation of matrix effects and performance of solid-phase extraction for LC-MS/MS analysis of *b*-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB) neurotoxins in cyanobacteria. *Analyst* **2012**, *137*, 1210–1219.
46. Scott, P.M.; Niedzwadek, B.; Rawn, D.F.K.; Lau, B.P.Y. Liquid chromatographic determination of the cyanobacterial toxin *b*-N-methylamino-L-alanine in algae food supplements, freshwater fish, and bottled water. *J. Food Prot.* **2009**, *78*, 1769–1773.
47. Yoshida, T. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: A review. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *60*, 265–280.
48. Agilent Technologies. Bond Elut Plexa PCX. Available online: <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/Sample-Preparation/Solid-Phase-Extraction-%28SPE%29/Bond-Elut-Plexa-PCX/Pages/default.aspx> (accessed on 13 November 2014).
49. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* **2008**, *74*, 1299–1312.
50. Jauffrais, T.; Herrenknecht, C.; Séchet, V.; Sibat, M.; Tillmann, U.; Krock, B.; Kilcoyne, J.; Miles, C.; McCarron, P.; Amzil, Z.; *et al.* Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 833–846.
51. Glover, W.B.; Liberto, C.M.; McNeil, W.S.; Banack, S.A.; Shipley, P.R.; Murch, S.J. Reactivity of β -Methylamino-L-alanine in Complex Sample Matrixes Complicating Detection and Quantification by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7946–7953.
52. Downing, S.; Contardo-Jara, V.; Pflugmacher, S.; Downing, T.G. The fate of the cyanobacterial toxin *beta*-N-methylamino-L-alanine in freshwater mussels. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2014**, *101*, 51–58.
53. Christensen, S.J.; Hemscheidt, T.K.; Trapido-Rosenthal, H.; Laws, E.A.; Bidigare, R.R. Detection and quantification of *beta*-methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2012**, *10*, 891–898.
54. Salomonsson, M.L.; Hansson, A.; Bondesson, U. 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. *Anal. Methods UK* **2013**, *5*, 4865–4874.

55. Downing, S.; Banack, S.A.; Metcalf, J.S.; Cox, P.A.; Downing, T.G. Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon* **2011**, *58*, 187–194.
56. Scott, L.L.; Downing, S.; Phelan, R.R.; Downing, T.G. Environmental modulation of microcystin and beta-N-methylamino-L-alanine as a function of nitrogen availability. *Toxicon* **2014**, *87*, 1–5.
57. Banack, S.A.; Caller, T.A.; Stommel, E.W. The cyanobacteria derived toxin beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins* **2010**, *2*, 2837–2850.
58. Lee, M.; McGeer, P.L. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1440–1447.
59. Field, N.C.; Metcalf, J.S.; Caller, T.A.; Banack, S.A.; Cox, P.A.; Stommel, E.W. Linking beta-methylamino-L-alanine exposure to sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Annapolis, MD. *Toxicon* **2013**, *70*, 179–183.
60. Pernet, F.; Malet, N.; Pastoureaud, A.; Vaquer, A.; Quéré, C.; Dubroca, L. Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. *J. Sea Res.* **2012**, *68*, 20–32.
61. Mondo, K.; Broc Glover, W.; Murch, S.J.; Liu, G.; Cai, Y.; Davis, D.A.; Mash, D.C. Environmental neurotoxins beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *70*, 26–32.
62. Weiss, J.H.; Christine, C.W.; Choi, D.W. Bicarbonate Dependence of Glutamate Receptor Activation by Beta-N-Methylamino-L-Alanine—Channel recording and study with related-compounds. *Neuron* **1989**, *3*, 321–326.
63. Okle, O.; Stemmer, K.; Deschl, U.; Dietrich, D.R. (L)-BMAA induced er stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma sh-sy5y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol. Sci.* **2013**, *131*, 217–224.
64. Stanier, R.Y.; Kunisawa, R.; Mandel, M.; Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 171–205.
65. Guillard, R.R.L.; Hargraves, P.E. *Stichochrysis-immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **1993**, *32*, 234–236.
66. Tompkins, J.; DeVille, M.M.; Day, J.G.; Turner, M.F. Culture collection of algae and protozoa. In *Catalogue of Strains*; Titus Wilson & Son lmtd: Ambleside, UK, 1995; p. 204.
67. Guillard, R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals*; Smith, W., Chanley, M., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 1975; pp. 29–60.

Chapitre 3 : Evaluation de la présence de la BMAA et ses isomères dans l'environnement

1. Contexte

Nous avons investi beaucoup d'effort dans le développement et l'optimisation d'une méthode d'analyse HILIC-SM/SM sensible et surtout sélective de la BMAA et ses isomères et ce pour réduire le risque de mauvaise identification/surestimation. Lors de l'application de cette méthode à des échantillons environnementaux, les trois analytes ont été détectés dans tous les mollusques de la lagune de Thau qui ont été analysés (*i.e.* échantillons prélevés l'été 2009). Ces résultats sont une confirmation de l'étude de Masseret et al. (2013) qui avaient déjà observé de la BMAA et du DAB dans des bivalves de cette zone conchylicole.

En France, le neurologue William Camu et le « réseau de méthodologie coordonnée d'investigation des agrégats spatio-temporels de SLA », impliqués désormais dans le programme BMAALS, avaient auparavant mis en évidence un cluster significatif de SLA autour de la lagune de Thau, avec une prévalence significative chez les conchyliculteurs. Dans ce contexte, la Direction scientifique de l'Ifremer a soutenu vivement ce sujet de thèse proposé par le laboratoire Phycotoxines afin de contribuer à acquérir des données scientifiques sur ce nouveau risque lié à la présence potentielle de BMAA dans les zones de production des mollusques bivalves en France métropolitaine.

2. Objectifs et approche méthodologique

L'étang de Thau (figure 22) est une zone conchylicole importante ($\geq 10\,000$ t/an d'huîtres produites selon Gangnery et al. (2003), soit environ 10 % de la production annuelle française). La lagune d'une profondeur moyenne de 5 m fait 19 km de long et 4,5 km de large. Les tables utilisées pour la culture des huîtres couvrent environ 20 % de la surface totale. La lagune est pratiquement close, avec seulement une connexion étroite avec la mer Méditerranée par le canal de Sète et d'autres plus petites qui sont négligeables en termes d'échanges d'eau. Son bassin versant est d'environ 300 km² et inclut des terres utilisées pour l'agriculture, des activités industrielles et le développement urbain.

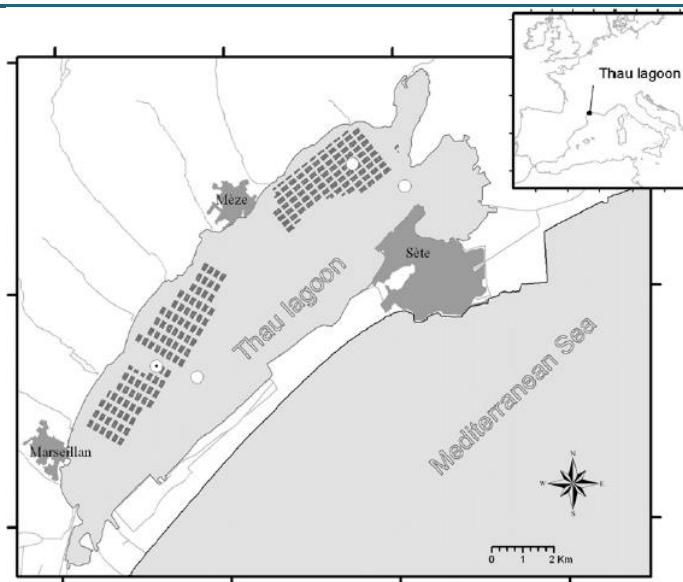


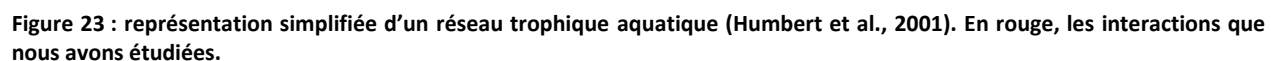
Figure 22 : Carte de l'étang de Thau. Les principales zones conchylicoles sont représentées par les zones quadrillées. Repris de Pernet et al. (2012).

La présence d'un cluster de SLA ainsi que la détection de BMAA et ses isomères dans les mollusques suggèrent qu'une attention particulière devrait être portée à la recherche des trois analytes (BMAA, DAB et AEG) dans cet écosystème lagunaire. Dans ce contexte, nos objectifs sont définis selon les quatre points suivants :

- suivre la présence de BMAA (et ses isomères) dans des moules de l'étang de Thau, mensuellement et sur une période allant de juillet 2013 à octobre 2014
 - quelle est leur occurrence, leur distribution au sein des tissus (glandes digestives/chairs restantes), la proportion de forme libre et associée aux protéines ?
- évaluer la présence de BMAA (et ses isomères) dans le périphyton puisque des traces de BMAA et DAB ont déjà été détectées dans cette matrice (Masseret, communication personnelle)
 - occurrence, proportion de forme libre/associée ?
- évaluer la présence de BMAA (et ses isomères) dans le plancton
 - occurrence, proportion de forme libre/associée ?
- mettre en culture et cribler des microalgues présentes dans la lagune mais aussi quelques espèces présentes sur la côte méditerranéenne et Atlantique
 - picocyanobactéries, picoeucaryotes, dinoflagellés, diatomées

Pour répondre à ces objectifs et en partenariat avec l'Ifremer de Sète (LER-LR), nous avons donc mis en place un échantillonnage mensuel couvrant la période juillet 2013 – octobre 2014. Des moules sauvages ont été prélevées et des traits de filet réalisés pour concentrer le plancton en suspension dans l'eau, avec des mailles de 20 μm et 63 μm (*i.e.* séparation du phytoplancton et du zooplancton). De plus,

Via cette approche, nous souhaitons évaluer la présence de BMAA (libre et associée aux protéines) ainsi que sa concentration dans différents compartiments de l'écosystème de Thau et voir s'il existe une bioaccumulation qui conduirait à des concentrations plus élevées de BMAA dans les mollusques (*i.e.* par échanges trophiques classiques, figure 23), comme rapporté en mer Baltique (Jonasson et al., 2010) ou dans le lac Taihu en Chine (Jiao et al., 2014).



3. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: distribution in different food web compartments of Thau Lagoon, French Mediterranean Sea

Article publié : Réveillon, D., E. Abadie, V. Séchet, E. Masseret, P. Hess and Z. Amzil (2015). " β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea." *Marine Environmental Research* 110: 8-18.

3.1. Résumé

La neurotoxine BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) et son isomère le DAB (2,4-diaminobutyric acid) ont été détectés dans de nombreux produits de consommation à travers le monde, notamment dans la lagune de Thau (Méditerranée française). Un cluster de sclérose latérale amyotrophique (SLA) a également été observé dans cette région. Des moules, périphytons (*i.e.* biofilms attachés aux moules) et du plancton ont été collectés entre juillet 2013 et octobre 2014 puis analysés avec une méthode HILIC-SM/SM. De la BMAA, du DAB et de l'AEG (N-(2-aminoethyl)glycine) ont été retrouvés dans pratiquement tous les échantillons de la lagune. Les concentrations de BMAA et DAB dans le plancton collecté en réalisant des traits de filet, le périphyton et les moules étaient en moyenne de 0,58 et 0,83 ; 2,6 et 3,3 ; 4,0 et 7,2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW, respectivement. *Synechococcus* sp., *Ostreococcus tauri*, *Alexandrium catenella* et huit espèces de diatomées ont été mises en culture et criblées pour rechercher la BMAA et ses isomères. Alors que *Synechococcus* sp., *O. tauri*, *A. catenella* ne produisent pas de BMAA dans nos conditions de culture et d'analyse, quatre espèces de diatomées contiennent à la fois de la BMAA et du DAB. Par conséquent, les diatomées peuvent être une source de BMAA pour les moules. Contrairement à la plupart des toxines de microalgues, la BMAA et le DAB ont été retrouvés en concentrations significatives en dehors des glandes digestives des mollusques.

3.2. Abstract

The neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and its isomer DAB (2,4-diaminobutyric acid) have been detected in seafood worldwide, including in Thau lagoon (French Mediterranean Sea). A cluster of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a neurodegenerative disease associated with BMAA, has also been observed in this region. Mussels, periphyton (*i.e.* biofilms attached to mussels) and plankton

were sampled between July 2013 and October 2014, and analyzed using HILIC-MS/MS. BMAA, DAB and AEG (N-(2-aminoethyl)glycine) were found in almost all the samples of the lagoon. BMAA and DAB were present at 0.58 and 0.83, 2.6 and 3.3, 4.0 and 7.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry weight in plankton collected with nets, periphyton and mussels, respectively. *Synechococcus* sp., *Ostreococcus tauri*, *Alexandrium catenella* and eight species of diatoms were cultured and screened for BMAA and analogues. While *Synechococcus* sp., *O. tauri* and *A. catenella* did not produce BMAA under our culture conditions, four diatoms species contained both BMAA and DAB. Hence, diatoms may be a source of BMAA for mussels. Unlike other toxins produced by microalgae, BMAA and DAB were detected in significant amounts in tissues other than digestive glands in mussels.

Key words: BMAA, Diatoms, *Chaetoceros* sp., seston, *Mytilus galloprovincialis*, HILIC-MS/MS

3.3. Introduction

BMAA and isomers (DAB, AEG and BAMA) are non proteinogenic amino acids that have been found in higher trophic levels in many ecosystems, e.g. Guam Island, the Baltic Sea and lake Taihu, China (Jiao et al., 2014; Jonasson et al., 2010; Murch et al., 2004a). BMAA has been associated with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Spencer et al., 1987). As a polar molecule, its bioaccumulation is uncommon but has been shown in the brain of patients who died of ALS but also of other neurodegenerative diseases (Murch et al., 2004b; Pablo et al., 2009). This accumulation is possibly justified by the misincorporation of BMAA into proteins during protein synthesis (Dunlop et al., 2013; Murch et al., 2004a). Consequently, BMAA may exist in two forms, as a free amino acid and bound to proteins. Recently, BMAA has been suggested to be either incorporated into or associated with proteins, since a fraction of “bound” BMAA was released by protein denaturation (Glover et al., 2014b). Hereafter, bound BMAA refers to the BMAA amount that is not extracted as a free amino acid, irrespective of its incorporated or associated form. Many different analytical methods have been employed to detect BMAA leading to controversial reports of BMAA in the environment (Faassen, 2014). However, several sample preparation and analytical procedures have now been well characterized, including those using different internal standards for accurate identification and quantification of BMAA and isomers in biological samples (Combes et al., 2013; Jiang et al., 2013; Reveillon et al., 2014).

Several cases of ALS have been linked to a possible long-term consumption of specific foodstuffs containing BMAA, e.g. crabs or lobsters (Banack et al., 2014; Field et al., 2013). In those studies, cyanobacteria were the suggested primary source of BMAA. However, in marine ecosystems, other

microalgal species (some diatoms and dinoflagellates) have recently been reported to contain bound BMAA and isomers. Similarly, marine mollusks were shown to contain BMAA and analogues in the same environments (Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014), thus highlighting potential bioaccumulation. Zooplankton organisms are a key component in some ecosystems, being consumers of phytoplankton and prey of higher-order consumers, thus playing an important trophic link (Gifford, 1991). Zooplankton has been suggested to be a vector of BMAA in aquatic animals in lake Taihu, China (Jiao et al., 2014), due to its ecological function and because BMAA has been reported to be bioaccumulated in zooplankton from the Baltic Sea (Jonasson et al., 2010).

In mussels and oysters from Thau lagoon, France, BMAA, DAB and AEG have independently been detected by two groups at similar levels (Masseret et al., 2013; Reveillon et al., 2014). However, the distribution of BMAA in different organs of filter-feeding bivalves has not been studied so far. Generally, cyanotoxins and phycotoxins are known to accumulate mainly in digestive glands (Ferraio and Kozlowsky-Suzuki, 2011), even more polar molecules such as saxitoxins (Bricelj and Shumway, 1998).

Bioaccumulation and depuration of aquatic toxins in mollusks have been well studied (Bricelj and Shumway, 1998; Ferraio-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011; Ibelings and Chorus, 2007; Jauffrais et al., 2012) except for BMAA. Mussels are known to bioaccumulate toxins to higher concentrations than other bivalves, making them good sentinel organisms (Bricelj and Shumway, 1998; Mafra et al., 2010). Detoxification kinetics are compound- and species-specific (Bricelj and Shumway, 1998). In the worst case, toxins can be retained for months, e.g. domoic acid in the scallop *Pecten maximus* (toxic for more than 295 days after contamination by the diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Blanco et al., 2002)).

With the aim of improving knowledge on the distribution of BMAA in different compartments of Thau lagoon ecosystem, mussels, periphyton (biofilms attached to mussel) and plankton were collected between July 2013 and October 2014. Diatoms are dominating the micophytoplankton community and they sustain the growth of mollusks of Thau lagoon (Dupuy et al., 2000; Pernet et al., 2012). However, ciliates (including abundant tintinnid populations) and zooplankton species have also been reported in the lagoon (Dupuy et al., 2000; (Lam-Hoai et al., 1997)) and could represent an alternative food source for the mussels. Indeed, mollusks are selective and opportunistic suspension-feeders, largely relying on phytoplankton but exhibiting different behavior depending on the season and the type of plankton communities (Lefebvre et al., 2009; Riisgard and Larsen, 2010; (Trottet et al., 2007)).

Samples were analyzed for both free and total BMAA, DAB and AEG to study the distribution of these molecules in different compartments of the Thau lagoon ecosystem and between digestive glands and remaining flesh of the mussels. As cyanobacteria had been considered to be the most likely source of marine-derived BMAA, and had been suggested as a source of BMAA in Thau lagoon in a previous

study (Masseret et al., 2013), we screened four strains of *Synechococcus* sp., previously isolated from Thau lagoon. Furthermore, emblematic protists isolated from this lagoon and available to this study included *O. tauri*, and two strains of *A. catenella*. In parallel, as diatoms were found in large quantities in Thau lagoon, eight species of diatoms were grown and screened for total BMAA and isomers.

3.4. Material and Methods

3.4.1. Chemicals and reagents

β -N-methylamino-L-alanine hydrochloride (BMAA, B107) and trichloroacetic acid (TCA, 33731) were purchased from Sigma-Aldrich, France, while N-2-aminoethylglycine (AEG, A1153) and 2,4-diaminobutyric acid dihydrochloride (DAB, D0083) were obtained from TCI, Belgium. D-2,4-diaminobutyric acid-2,3,3,4,4-²D₅ dihydrochloride (D₅DAB), used as the internal standard, was purchased from CDN isotopes (CIL, France).

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained as HPLC grade solvents from JT Baker. Water for analysis was supplied by a Milli-Q integral 3 system (Millipore, France). Solutions of formic acid (FA, 33015), hydrochloric acid 37% (HCl, 258148) and ammonium hydroxide (NH₄OH, 221228), all reagent grade, were purchased from Sigma-Aldrich, France.

3.4.2. Samples

3.4.2.1. Samples collected in Thau lagoon in 2013-2014

The Mediterranean lagoon of Thau, France, is an important area for farming oysters (*Crassostrea gigas*) (Gangnery et al., 2003) and, to a lesser extent, mussels (*Mytilus galloprovincialis*) (Gangnery et al., 2004).

Samples were collected at location 104-P-037 (figure 24) of the chemical contaminants monitoring network in France ROCCH (Claisse and Raffin, 2010) from July 2013 to October 2014. During this period, samples of wild mussels (17), periphyton, *i.e.* biofilms attached to mussels, (13) and of seston, *i.e.* all particles, including plankton suspended in water, (17) were collected with phytoplankton nets of 20, 40 or 63 μ m mesh size.

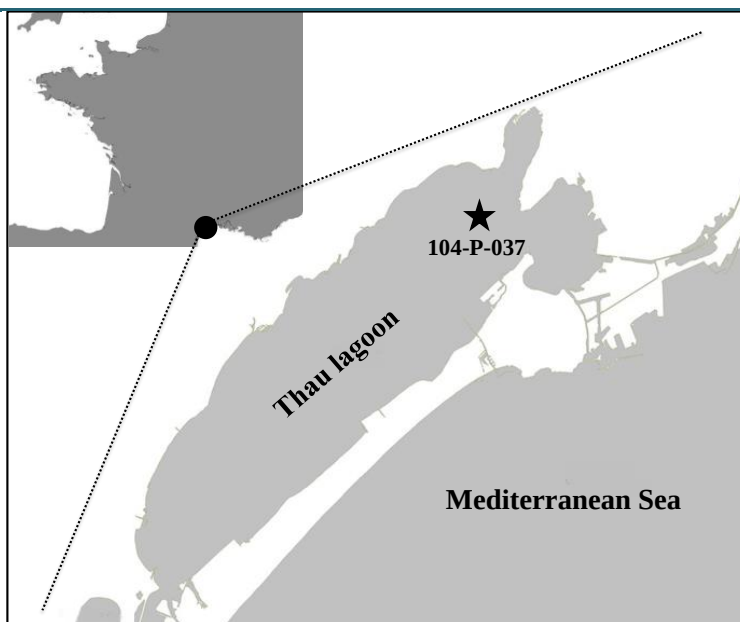


Figure 24: map of Thau lagoon showing the sampling location (104-P-037)

Species identification of periphyton and seston samples was not performed except for the plankton biomass collected after July 8, 2014. From this date, the procedure to collect plankton was adapted to discriminate phytoplankton from zooplankton. Thereafter, samples were pre-filtered through a 125 μm plankton net to remove any large zooplankton or algal debris and filtered through a 20 μm screen to obtain a microphytoplankton fraction ($> 20 \mu\text{m}$ and $< 125 \mu\text{m}$) while the zooplankton fraction ($> 63 \mu\text{m}$) was obtained with the 63 μm mesh size net. Identification of major species of plankton was made according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1958).

Plankton biomass was harvested via centrifugation at 4000 g for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. All samples were freeze-dried, homogenized and stored at room temperature. Both free (when material was available) and total BMAA, DAB and AEG were analyzed. The concentration of bound BMAA and isomers was obtained as the difference between total and free concentrations. For mussels, aliquots of freeze-dried digestive glands (DG) and remaining flesh (RF) tissues ($n \geq 12$) were separately quantified.

3.4.2.2. Microalgal cultures

The non-axenic strains of microalgae that were screened for the presence of BMAA, DAB and AEG and their conditions of culture are summarized in table 15.

Table 15: origin and culture conditions of microalgal strains screened for total BMAA, DAB and AEG. Culture media were prepared accordingly to Walne (1970) for Conway medium, Provasoli (1968) for ESP medium, Guillard and Hargraves (1993) for L1 medium, Keller et al. (1987) for K medium and Harrison et al. (1980) for ESAW medium. Here, the ESAW medium was modified by adding ammonium chloride (final concentration of 563 μM).

Strain	Origin	Culture media / days of growth (d)	Irradiance ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) / Light:dark cycle (h) / Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
Diatoms			
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	CCMP 1315	Conway / 11	60 / 16:8 / 22
<i>Chaetoceros</i> sp.	Argenton (France)	Conway / 11	60 / 16:8 / 22
<i>Chaetoceros pumilum</i>	Argenton (France)	Conway / 11	60 / 16:8 / 22
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CCAP 1055/1	Conway / 11	60 / 16:8 / 22
<i>Skeletonema marinoi</i>	CCMP 1332	L1 / 11	60 / 16:8 / 22
<i>Skeletonema pseudocostatum</i>	Bouin (France)	ESP / 28	50 / 12:12 / 16
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCMP 1015	Conway / 11	60 / 16:8 / 22
<i>Thalassiosira weiss flogii</i>	CCMP 1336	Conway / 11	60 / 16:8 / 22
Dinoflagellates			
<i>Alexandrium catenella</i>	Thau lagoon (C2-4)	L1 - Si / 10	90 / 16:8 / 17
<i>Alexandrium catenella</i>	Thau lagoon (C11-4)	L1 - Si / 10	90 / 16:8 / 17
Cyanobacteria			
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206V)	Modified ESAW / 11	20 / 16:8 / 22
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206R)	Modified ESAW / 11	20 / 16:8 / 22
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206H6)	Modified ESAW / 11	20 / 16:8 / 22
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206D8)	Modified ESAW / 11	20 / 16:8 / 22
Prasinophyceae			
<i>Ostreococcus tauri</i>	Thau lagoon (H95)	K - Si / 41	200 / 16:8 / 23

- Si, without silicate

Most of the diatom strains originated from culture collections while some were isolated from different coastal locations in France. *Synechococcus* sp., *Alexandrium catenella* (C2-4 and C11-4) and *Ostreococcus tauri* were all isolated from Thau lagoon. *Synechococcus* sp. TES 206V (chlorophyll-rich), TES 206R (phycoerythrin-rich) are polyclonal while TES 206H6 and 206D8 are assumed to be monoclonal strains isolated from TES 206R. *Skeletonema pseudocostatum* was isolated from Bouin, Atlantic coast, France. *Chaetoceros* sp. and *Chaetoceros pumilum* were isolated from Argenton, English Channel, France. The culture media were prepared with natural filter-sterilized seawater (0.2 μm) at a salinity of 35. All microalgae were grown in batch culture, and were harvested via centrifugation at 4000 g for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. Supernatant was carefully removed using Pasteur pipetting and the resulting pellet was freeze-dried, homogenized and stored at room temperature until extraction of total BMAA, DAB and AEG.

3.4.3. Sample preparation

The procedures for extraction of BMAA, DAB and AEG (both in free and total form), and for analysis were optimized in a previous study (Reveillon et al., 2014). Briefly, deuterated DAB (D_5 DAB at a final concentration of 50 ng.mL^{-1}), used as internal standard ($750 \mu\text{L}$ solution, in 0.1 M TCA), was added to freeze-dried shellfish and periphyton (15 mg) or wild and cultured phytoplankton (10 mg). The mixture was ground with glass beads (0.5 g) in a mixer mill (Retsch MM400, Germany) for 30 min . For the extraction of free analytes, supernatants were filtered after grinding and directly cleaned up by SPE. For the extraction of total BMAA and isomers, supernatants were collected and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40°C . The residue was dissolved in $600 \mu\text{L}$ HCl (6 M) and hydrolyzed at 99°C for 24 h . HCl was dried, and the residue was dissolved in 1 mL of TCA (0.1 M) before SPE clean-up. SPE was performed on Bond Elut® Plexa PCX cartridges (Agilent Technologies, VWR, France).

3.4.4. HILIC-MS/MS analysis

The LC-MS/MS system consisted of an Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC) (Shimadzu, France) coupled with a triple-quadrupole mass spectrometer (5500 QTRAP, AB Sciex, France). BMAA, DAB and AEG were separated on a ZIC®-HILIC column ($150 \times 2.1 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Merck Sequant®, France) with a TSK gel amide 80 guard column ($2 \times 10 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). The linear gradient elution program of the binary mobile phase (solvent A: water with 0.1% formic acid; solvent B: acetonitrile with 0.1% formic acid) was as follows: 0 min , $37\% \text{ A}$; 18 min , $55\% \text{ A}$; 20 min , $55\% \text{ A}$; 23 min , $37\% \text{ A}$ and 38 min , $37\% \text{ A}$. The flow rate was 0.2 mL.min^{-1} , the column temperature 30°C while samples were kept at 4°C and the injection volume was $5 \mu\text{L}$.

The MS/MS analysis was performed in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) detection. BMAA, DAB and AEG were unambiguously distinguished thanks to chromatographic resolution, specific mass spectral transitions and ion ratios (the peak area ratio between the mass spectral transitions m/z $119 > 76$ and $119 > 88$ was also considered for the identification of BMAA). Transition m/z $119 > 102$ (common to all three analogues) was used to quantify BMAA, DAB and AEG, while transition m/z $124 > 47$ was used to quantify D_5 DAB.

BMAA and isomers were quantified using a five-point calibration curve of pure standards prepared by dilution series ($1\text{--}100 \text{ ng.mL}^{-1}$) of stock solutions in a mixture of ACN and water ($63:37$, v/v, both containing 0.1% FA), i.e. the starting condition of the chromatographic gradient. A corrective factor derived from D_5 DAB recovery was applied to more accurately quantify BMAA, DAB and AEG. All other

instrument parameters were the same as mentioned previously (Reveillon et al., 2014). The software Analyst 1.5.1 was used to reprocess the acquired raw data.

3.4.5. Statistical Analysis

SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) was used to perform t-tests.

3.5. Results and Discussion

3.5.1. Sample preparation and analysis

We used a selective and sensitive HILIC-MS/MS method that had previously been optimized (Reveillon et al., 2014). This method allowed us to accurately identify and quantify BMAA, DAB and AEG in biological matrices, using D₅DAB as internal standard. In this study, the total recovery of D₅DAB was consistent with the results that we have reported in (Reveillon et al., 2014) but also with (Jiang et al., 2013) who observed a total recovery of BMAA of 63.3% for spirulina tablets extracted with a similar sample preparation procedure. Indeed, average recoveries ranged from 53.9 to 60.4% for microalgae and plankton collected with nets and from 56 to 66% for mollusk matrices, extracted for both free and total BMAA and isomers. The relative standard deviation was between 8.9 and 18.8% indicating adequate reproducibility of the sample preparation procedures. However, the recoveries in periphyton matrix were significantly lower (from 28.1 to 29.4%). A group working with freshwater biofilms has also reported lower recoveries of BMAA and DAB in this matrix, in comparison to cyanobacteria and water samples (Combes et al., 2013).

A compound eluting just before BMAA was observed in hydrolyzed environmental samples of periphyton (figure 25) and plankton, as well as in bivalves as previously reported for hydrolyzed mussels and oysters (Réveillon et al., 2014).

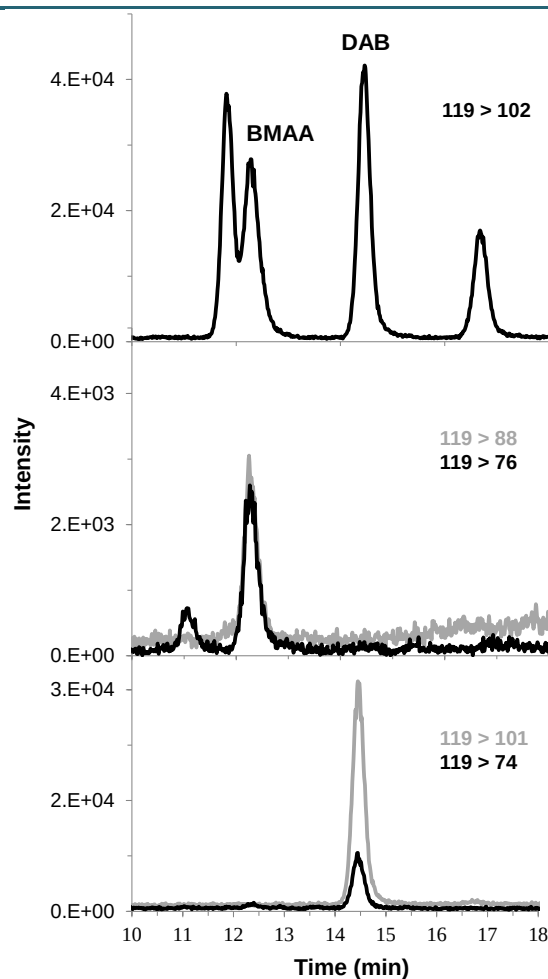


Figure 25: extracted ion chromatograms of periphyton of March 2014

3.5.2. Temporal and spatial distribution of BMAA and isomers in environmental samples

The presence of BMAA, DAB and AEG has been reported in sporadically collected mollusks from Thau lagoon (Masseret et al., 2013; Reveillon et al., 2014). For this study, monthly sampling was carried out for over a year (July 2013 to October 2014). In addition to mussels, periphyton (*i.e.* biofilms attached to mussel) and seston were also collected with phytoplankton nets in order to verify the presence and the distribution of BMAA and isomers in different compartments of the Thau lagoon ecosystem and in different mussel tissues.

3.5.2.1. Monitoring of BMAA and isomers in mussels from Thau lagoon

BMAA was always detected but quantified in its free form in only 16 out of 34 mussel samples (LOQ was $0.15 \mu\text{g.g}^{-1} \text{DW}$), mostly during the summer but in significantly lower concentrations compared to bound BMAA (Figure 32, supplementary material). AEG was found in 31 of 34 samples and only 5

samples, collected during summer 2014, showed quantifiable amounts of AEG in the free form. On the opposite, DAB was detected both in free and bound forms, in all samples. For all isomers, higher amounts were detected as bound form. Indeed, free concentrations of BMAA, DAB and AEG ranged from below the limit of detection to 1.2, 6.2 and 0.31 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW, respectively, while maximal concentrations of their total form were 9.7, 10.7 and 1.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW, respectively. In a previous study (Reveillon et al., 2014), mollusks from Thau lagoon had been screened as a cluster of ALS had recently been reported in this important bivalve farming area, concurrently with the presence of BMAA and DAB in reared mollusks (Masseret et al., 2013). In that study, oysters collected in 2009 and mussels collected at different seasons between 1995 and 2008 contained similar amounts of BMAA and DAB (0.6-6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW), suggesting that these two isomers were repeatedly present in mollusks over several decades. Here, we report the presence of BMAA, DAB and AEG in all samples of Thau lagoon mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected monthly between July 2013 and October 2014.

The presence of BMAA in seafood (as well freshwater foodstuffs) was reported worldwide. Indeed, blue crabs from Chesapeake Bay, USA ($< 115.2 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) (Field et al., 2013), lobsters collected in Florida Bay ($< 27 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) (Banack et al., 2014), fishes from Nebraska reservoirs ($< 2.6 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) (Al-Sammak et al., 2014), dietary supplements from shark cartilage ($< 352 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) (Mondo et al., 2014), cockles from Portuguese coasts ($< 0.43 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) (Lage et al., 2014), mussels, oysters and different fish species from the Baltic Sea ($< 1.3 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW and $< 1.6 \mu\text{g.g}^{-1}$ wet weight) (Jonasson et al., 2010; Salomonsson et al., 2013), even seafood purchased in Swedish markets ($< 0.9 \mu\text{g.g}^{-1}$ wet weight) (Jiang et al., 2014b) and fishes and invertebrates from Gonghu Bay, China ($< 36 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW) (Jiao et al., 2014) were shown to contain various amounts of BMAA, depending on the matrix and the analytical method used. DAB and/or AEG were only analyzed for in few of these studies but DAB concentrations were generally similar to those of BMAA.

The survey from July 2013 to October 2014 provided insight into the distribution of BMAA and isomers in mussels from Thau lagoon, including seasonal variations. Concentrations of DAB were relatively constant throughout the sampling period, irrespective of the free or total form and the organ considered (Figure 32 supplementary material). The overall mean concentration of total DAB in remaining flesh (RF) and digestive gland (DG) tissues was 7.2 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW, with a relative standard deviation of only 22%. On the opposite, the concentration of total BMAA varied and showed two time-dependent increases in summer/autumn seasons in 2013 and 2014. High levels of total BMAA (from 3.8 to 14.4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW) has also been observed throughout the summer of 2009 in mussels from Thau in a previous study (Reveillon et al., 2014). Similarly, Masseret et al., 2013 also reported higher concentrations of BMAA in mussels collected at the same location during summer. The pattern of BMAA

presence in mussels of the lagoon could be due to cycles of accumulation/depuration, as a result of feeding, in analogy to the hypothesis formulated for contaminated cockles in Portugal, feeding at least partially on the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* that was shown to contain bound BMAA (Lage et al., 2014). The higher seasonal variability in BMAA concentrations compared to DAB may also be due to the generally much wider presence of DAB in all phytoplankton and cyanobacterial species analyzed.

3.5.2.2. Distribution of BMAA and isomers in mussels digestive glands (DG) and remaining flesh (RF) tissues

We discriminated concentrations of BMAA and its isomers between digestive glands (DG) and remaining flesh (RF), so these tissues were separately analyzed (figure 26).

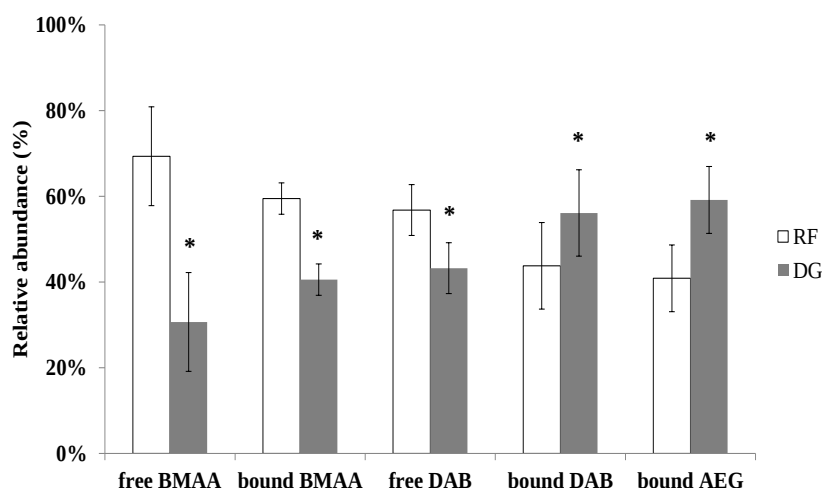


Figure 26: relative abundance (mean ± SD) of free and bound BMAA and isomers between digestive gland (DG) and remaining flesh (RF) tissues of all mussel samples collected during the sampling period. Free AEG concentrations were rarely detected so only relative abundance of bound AEG are represented. * $P < 0.05$ in comparison to the relative abundance in the remaining flesh tissue (t-test).

Relative abundance of BMAA, DAB and AEG all differed significantly between digestive glands and remaining flesh of mussels ($P < 0.05$). Indeed, free and bound BMAA were more present in RF tissues and accounted respectively for $69.3\% \pm 17\%$ and $59.5\% \pm 6\%$ (mean ± RSD) of the BMAA concentrations in mussels. On the opposite, concentration of bound AEG was significantly higher in DGs. Concerning DAB, while free concentration was significantly higher in RFs, the tendency was reversed for bound DAB which was significantly more present in DGs. This differential distribution is somewhat surprising, considering the small differences at molecular level of these amino acids. However, differences between analogs had already been observed in an *in vitro* model for protein incorporation (Glover et al., 2014a). The distribution of BMAA and DAB within mussel tissues was unusual in comparison to other cyanotoxins and phycotoxins Toxins accumulating in filter-feeding bivalves as a function of consumption of

microalgae were mainly found in digestive glands or viscera, independently of the polarity of the toxins, with proportions ranging from 70 to 95% in the digestive gland for both freshwater and marine mollusks (Blanco et al., 2007; (Bricelj et al., 1990); Jauffrais et al., 2012; Lassus et al., 2007; Mafra et al., 2010; Medhioub et al., 2010; Negri and Jones, 1995; Strogyloudi et al., 2006; Vasconcelos, 1995). As far as we know, few data concerning the distribution of BMAA in mollusks are available in the bibliography. Only one study focused on the bioaccumulation of dissolved labeled $^{5+}$ BMAA but no distinction was made between organs of the freshwater mussels (Downing et al., 2014). However, our results confirmed the report of (Andrys et al., 2015) about the presence of BMAA both in the visceral (gut) and non-visceral (mantle) tissues of *M. edulis*, raising a question about the bio-incorporation and the metabolization of BMAA in blue mussel.

BMAA and DAB, as non proteinogenic amino acids, have recently been suggested to be incorporated into proteins during protein synthesis or associated with proteins through non-specific binding (Dunlop et al., 2013; Glover et al., 2014b; Xie et al., 2013). The amount of incorporated BMAA was even higher in organs with a high rate of protein synthesis, like the liver for rat (Karlsson et al., 2014). Even if it remains to be demonstrated in controlled conditions, BMAA and DAB could be accumulated in mussels via the incorporation into proteins, as it was suggested to explain the biomagnification of BMAA in the Guam ecosystem (Murch et al., 2004a).

3.5.2.3. BMAA and isomers in periphyton and seston collected in the Thau lagoon

To further increase our knowledge about the distribution of BMAA in different compartments of the Thau lagoon ecosystem, we collected different samples of plankton. Both periphyton (*i.e.* biofilms attached to the shell of mussels) and seston were analyzed for free and total BMAA and isomers.

Periphyton consists of biofilms that are assemblages of aggregated microorganisms and particles that are attached to a substrate (*i.e.* on the shell of mussels in this study). Unfortunately, species identification of periphyton samples from Thau lagoon was not performed, however, in a previous unpublished study diatom species had been observed in periphyton from Thau lagoon (E. Masseret, personal communication). Similar concentrations of total BMAA and DAB were observed, ranging from 1.3 to 4.3 and 1.3 to 4.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW while concentrations of total AEG were lower (figure 27). Only DAB was detected in its free form, in 11 out of the 13 samples and in low concentrations (mean of 0.49 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

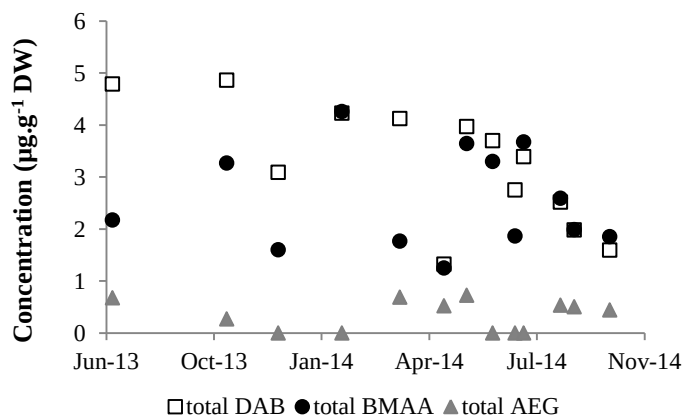


Figure 27: concentrations of total DAB (empty squares), BMAA (black circles) and AEG (grey triangles) found in periphyton samples.

Temporal variability was observed in our study for both BMAA and DAB in periphyton. Periphyton is a dynamic structure whose communities respond very rapidly to changes in environmental conditions, for both natural and anthropogenic origins, making them useful tools and indicator of biotic integrity and water quality (Dahl and Blanck, 1996; Hill et al., 2000; Nayar et al., 2003; Gaiser et al., 2011). Therefore, seasonal variability is expected to occur. It is not proven that mussels directly feed on periphyton but they may possibly feed on periphyton grazers (Hillebrand et al., 2002), or on diatoms and other organisms constitutive to periphyton in Thau lagoon.

While we do not know if mussels typically feed on periphyton in Thau lagoon, they are known to feed on phytoplankton or zooplankton, the major components of seston. We detected BMAA and DAB, almost exclusively in their bound form, in seston collected with phytoplankton nets (figure 28). Unlike for periphyton matrix, no AEG was detected in these samples. We detected BMAA and DAB in seston dominated by either microalgae or zooplankton, and even when species of both organisms were found in similar proportion (e.g. September 3 and October 6, 2014). The mean concentrations ($\pm$ SD) of BMAA were $0.49 (\pm 0.30)$ and $0.63 (\pm 0.30) \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$ in the microalgae and zooplankton-dominated fractions, respectively. Concerning DAB, the concentrations in the two fractions were $0.69 (\pm 0.39)$ and $0.92 (\pm 0.44) \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$.

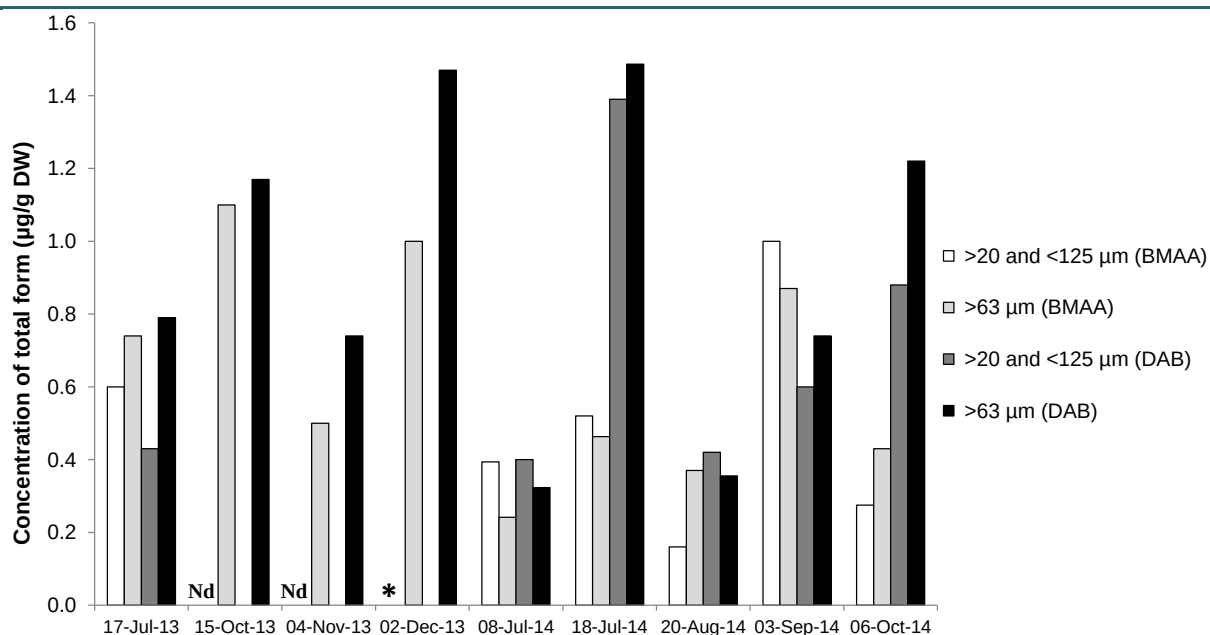


Figure 28: concentrations of total BMAA and DAB in seston collected with phytoplankton nets of 20 and 63 µm, depending on the date of sampling. Note: * only biomass collected with a 63 µm mesh size net was sampled on December 2, 2013 while Nd: BMAA and DAB were not detected in the seston collected with a 20 µm screen on October 15 and November 4, 2013.

The composition of plankton collected from July 8, 2014 was reported in table 17, supplementary material. Unfortunately sampling procedure did not lead to size fractions that clearly contained only phyto- or only zooplankton. As expected, phytoplankton (mostly diatoms) were more abundant in seston > 20 µm while zooplankton (mainly copepods) dominated the biomass in seston > 63 µm. The screening of seston samples did not allow us to identify specific organisms containing BMAA in Thau lagoon. However, the presence of BMAA and DAB in these samples suggested that some plankton species, on which mussels can feed, did contain these two non proteinogenic amino acids. However, the plankton community in the seston collected occasionally did not reflect the overall plankton community between July 2013 and October 2014. Therefore, the database of the French national monitoring program on phytoplankton and phycotoxins (REPHY) was interrogated for species specific information during our sampling period.

3.5.3. Phytoplankton community and culture of organisms as possible sources of BMAA in Thau lagoon

3.5.3.1. Phytoplankton species identification from the national monitoring program REPHY

In this program, phytoplankton experts identify and count all phytoplankton organisms >20 µm, as well smaller organisms if these are chain- or colony-forming, according to the Utermöhl method

(Utermöhl, 1958). From July 2013 to October 2014, diatom abundances accounted for 89% of the microphytoplankton, with high proportions of *Chaetoceros* sp., *Pseudo-nitzschia* sp., *Ceratoneis closterium* and *Skeletonema costatum*, depending on the season (figure 30). Diatoms were always present but bloomed mainly in summer. *Chaetoceros* sp. was largely dominating the biomass except in winter, when a peak of *Skeletonema costatum* occurred. Previous studies have shown that *Chaetoceros* sp. was the main diatom species in the microplankton on several occasions separated by several years, indicating that this species is regularly abundant in Thau lagoon (Pernet et al., 2012; (Vaquer et al., 1996)). Data from this study, as well from previous studies, thus confirmed that diatoms, in particular *Chaetoceros* sp., were highly abundant during the sampling period and could have been an important food source for zooplankton and mussels. As previously mentioned, the presence of diatoms is noteworthy since diatoms have recently been suggested to contain bound BMAA (Jiang et al., 2014a) and they sustain the growth of mollusks in Thau lagoon (Dupuy et al., 2000; Pernet et al., 2014; Pernet et al., 2012). However, the production of BMAA by microalgae from Thau lagoon has not been studied so far and the assertion of Jiang et al., 2014a saying that “BMAA production might be common among diatoms” should be confirmed. Therefore, we have undertaken culture of several phytoplankton organisms that have been identified in Thau lagoon, either during previous studies or as part of the REPHY program.

3.5.3.2. BMAA and its isomers in cultivated cyanobacteria and other microalgae

Cyanobacteria have been the first organisms suspected to be BMAA-producers (Cox et al., 2005). The dominance of diatoms and dinoflagellates in some marine ecosystems, concurrently with the occurrence of BMAA in mollusks, has led some groups to investigate the potential production of BMAA by these abundant microalgal species (Jiang et al., 2014a; Jiang and Ilag, 2014; Lage et al., 2014), increasing the number of potential BMAA-producing microalgae. We screened four strains of the cyanobacteria *Synechococcus*, previously isolated from Thau lagoon as well as several other, emblematic protists isolated from this lagoon: *O. tauri*, and two strains of *A. catenella*. As diatoms were abundant in Thau lagoon, including several reports of *Chaetoceros* sp., we also screened eight species of diatoms, including three *Chaetoceros* species. BMAA was detected in four out of the eight species of diatoms (table 16) and was not detected in any other class. Concerning the two isomers of BMAA, DAB was found in all microalgae while AEG was only detected in four of the eukaryotic strains.

Table 16: concentrations of total BMAA, DAB and AEG in the 15 lab-cultured microalgae.

Strain	Origin	Concentration of total form (μg.g ⁻¹ DW)		
Diatoms		BMAA	DAB	AEG
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	CCMP 1315	0.32	3.9	< LD
<i>Chaetoceros</i> sp.	Argenton (France)	0.58	29	< LD
<i>Chaetoceros pumilum</i>	Argenton (France)	< LD	5.5	< LD
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CCAP 1055/1	0.51	1.3	< LD
<i>Skeletonema marinoi</i>	CCMP 1332	< LD	1.1	< LD
<i>Skeletonema pseudocostatum</i>	Bouin (France)	< LD	1.6	0.28
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CCMP 1015	0.75	18	< LD
<i>Thalassiosira weiss flogii</i>	CCMP 1336	< LD	1.1	< LD
Dinoflagellates				
<i>Alexandrium catenella</i>	Thau lagoon (C2-4)	< LD	1.3	0.53
<i>Alexandrium catenella</i>	Thau lagoon (C11-4)	< LD	3.7	0.61
Cyanobacteria				
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206V)	< LD	1.3	< LD
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206R)	< LD	2.0	< LD
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206H6)	< LD	1.9	< LD
<i>Synechococcus</i> sp.	Thau lagoon (TES 206D8)	< LD	4.7	< LD
Prasinophyceae				
<i>Ostreococcus tauri</i>	Thau lagoon (H95)	< LD	8.7	4.7

< LD: no peak or a peak inferior to the limit of detection ($0.23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) was observed at a retention time corresponding to the standard

The concentrations of BMAA in the four diatom species ranged from 0.32 to $0.75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. BMAA has recently been detected in all diatom strains analyzed by a Swedish group (Jiang et al., 2014a), including one *Thalassiosira* sp. (CCAP 1085/15) and two *Skeletonema marinoi* isolates. In contrast to our results, this group reported concentrations $< 0.003 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, i.e. ca. 100-fold lower than concentrations in the present study. That group focused on the concentration of bound BMAA while we analyzed the total form. As sample preparation in case of the Swedish study included a protein precipitation step (not used in our study), the difference in results may derive from this difference. The Swedish study introduced this step due to column effects observed when injecting hydrolyzed crude extracts. We did not observe such effects in our method and did also not observe any interference for BMAA in diatom extracts (figure 29). Ion ratios for the different transitions in diatom extracts were equivalent to those of standards for all samples in which BMAA was detected.

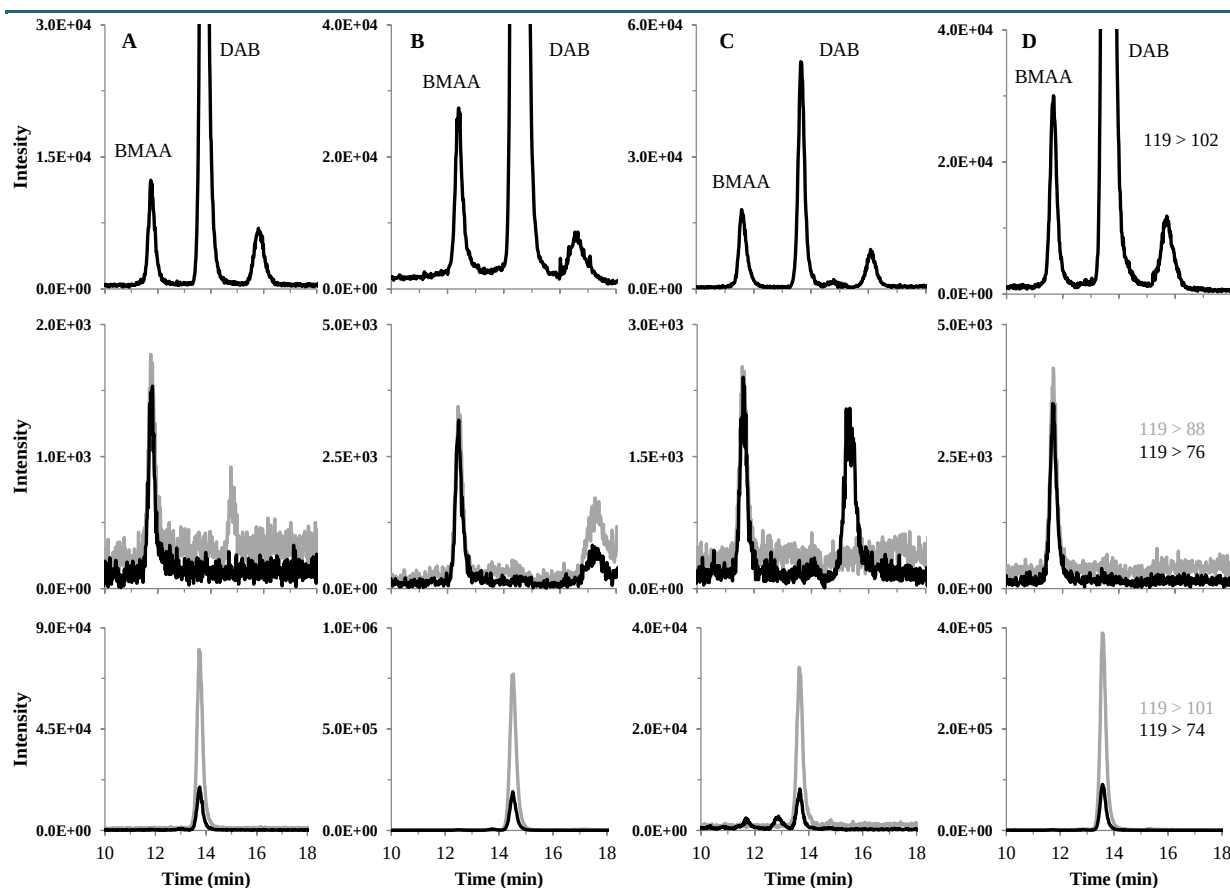


Figure 29: extracted ion chromatograms of (A) *Chaetoceros calcitrans* CCMP 1315, (B) *Chaetoceros* sp. from Argenton, (C) *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1 and (D) *Thalassiosira pseudonana* CCMP 1015.

The confirmation that diatoms contained BMAA is of particular importance since they contribute significantly to the diet of mussels and oysters in Thau lagoon (Dupuy et al., 2000; Pernet et al., 2012). Specifically, BMAA was found in two out of the three *Chaetoceros* strains (including one isolated from the French coast) and *Chaetoceros* sp. was one of the most abundant microalgae in Thau lagoon between July 2013 and October 2014 (figure 30). DAB and AEG were observed in previous studies focusing on the production of BMAA by dinoflagellates and diatoms, but no concentrations have been reported to date (Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014). DAB concentrations in our cultures showed variability and ranged from 1.1 to 29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, which is in the same order of magnitude (between 0.5 and 370 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) and variability as concentrations reported for cyanobacteria (McCarron et al., 2014; Reveillon et al., 2014; Rosen and Hellenas, 2008).

The toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* was screened since some dinoflagellates have been suggested to produce BMAA (Lage et al., 2014). *Ostreococcus tauri*, the smallest known eukaryote, is also very abundant in Thau lagoon (Dupuy et al., 2000; Vaquer et al., 1996), and was therefore also tested as a potential source organism. Interestingly, these two species did not produce BMAA under our

culture conditions, yet they did produce DAB and AEG, and could thus be a primary source for these isomers in the zooplankton and the mussels of the lagoon. However, *O. tauri* was reported to be poorly retained by oysters of Thau lagoon (Dupuy et al., 2000), suggesting that this picoeukaryote could not be a valuable direct trophic resource for mussels.

According to Masseret et al., 2013, Thau lagoon experienced a bloom of picocyanobacteria (mostly *Synechococcus* sp.) during the summer of 2009. Neither free nor bound BMAA were found in the four strains of *Synechococcus* sp. isolated from Thau lagoon in 2006. However, further work should be done on a nitrogen stress because the BMAA content has been suggested to be modulated by nitrogen availability in cultured and environmental samples of cyanobacteria (Downing et al., 2011; Scott et al., 2014). While picocyanobacteria could have been a source of BMAA, bioaccumulation in filter-feeding bivalves would require an additional indirect vector (Masseret et al., 2013).

Finally, another hypothesis would be based on the presumption that BMAA production in diatoms could be derived from bacterial symbionts. Interactions between bacteria and diatoms are known to occur and may affect growth, aggregation or toxin production (Doucette, 1995; Gardes et al., 2011; Grossart et al., 2005). For example, bacteria played an important but nonessential role in domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bates et al., 1995). Even though it was reported for DAB [see (Banack et al., 2010) for more precisions], it is not known if bacteria can directly produce BMAA. We did not use axenic cultures of diatoms, and generally, mussels are able to accumulate and assimilate bacteria from the surrounding environment (Cavallo et al., 2009), and more efficiently when bound in marine aggregates (Kach and Ward, 2008). At this stage, we can therefore not infer whether or not bacterial symbionts play a role in bacterial synthesis of BMAA in association with diatoms. There are also no reports on the biosynthetic pathway of BMAA in cyanobacteria and thus, the presence of BMAA in *Phaeodactylum tricornutum* is particularly interesting as this diatom species has been sequenced (Bowler et al., 2008), which would be helpful in studying the biosynthesis and metabolism of BMAA. Overall, and particularly following recent methodological developments (Faassen, 2014), biosynthesis of BMAA should be revisited in a number of species to gain a clearer picture on the distribution throughout all classes of microorganisms.

3.5.4. Hypothesized bioaccumulation pathway in different compartments of the Thau lagoon ecosystem

Based on a previous study (Cox et al., 2005), picocyanobacteria of the genus *Synechococcus* were suggested to contain BMAA, being grazed upon by zooplankton which would be the carrier of BMAA to

mollusks of Thau lagoon (Masseret et al., 2013). Nevertheless, diatoms, now reported as BMAA-producers, are highly abundant in the phytoplankton community and are suggested to sustain the growth of mollusks in the important bivalve farming area of Thau lagoon (Pernet et al., 2012). This trend was also confirmed in our study (figure 30). The presence of BMAA in several diatom cultures (both from culture collections and from French coastal regions) and in environmental samples (from Thau lagoon) and the absence of BMAA in the four *Synechococcus* strains from Thau lagoon all suggest that the bioaccumulation pathway of BMAA in this ecosystem should be revised. However, our results cannot exclude the earlier hypothesis of cyanobacterial BMAA production in this lagoon as the picoplanktonic fraction was not sampled in this study.

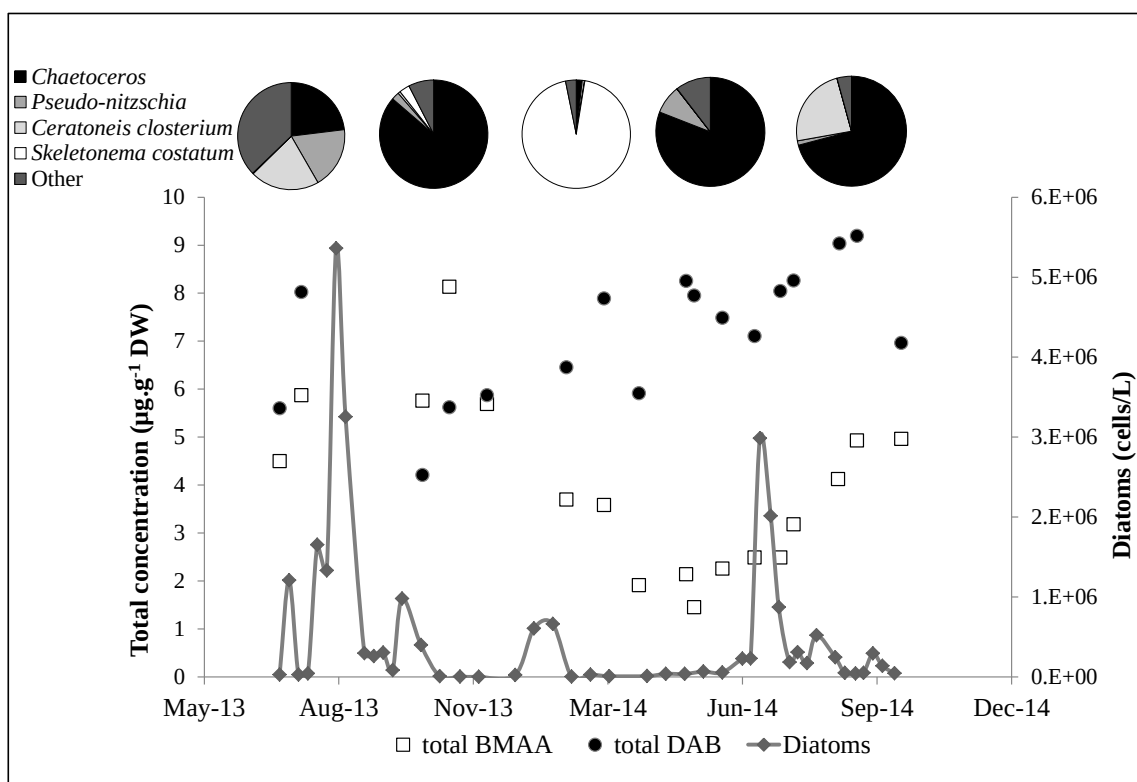


Figure 30: total BMAA and DAB (μg.g⁻¹ dry weight, expressed as the mean of concentrations in digestive glands and remaining flesh) in mussels collected in Thau lagoon, and diatom abundance (cells.L⁻¹) determined by the REPHY during the same period at the same sampling point. The pie charts on the top of the graph represent proportions of major species of diatoms as a function of the season (sum over three month periods).

The concentration of BMAA in mussels seemed to be linked to the abundance of diatoms during the sampling period (figure 30). Indeed, the peaks of diatom abundance, in summer 2013 and 2014, were followed by accumulation of BMAA in mussels. On the opposite, BMAA concentration decreased slowly during winter and spring, when diatom abundances dropped, until a new bloom of diatoms

appeared the following spring. DAB concentrations did not depend on diatoms abundances, which is coherent with the presence of this analogue in all species analyzed. BMAA concentrations in the remaining flesh of mussels never decreased to less than $2 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW between July 2013 and October 2014. The long accumulation and retention of BMAA in mussels may be coherent with the strong association with (and potentially incorporation into) proteins. Furthermore, the increase of BMAA concentrations was relatively slow and lasted for a few months after the peak of diatom blooms, which suggests that additional uptake routes via zooplankton might play a significant role in the BMAA food chain of Thau lagoon.

As suspension-feeding aquatic animals, bivalve mollusks have specialized in grazing on particles of a wide range of size, ranging from bacteria ($< 2\mu\text{m}$) to zooplankton ($> 200\mu\text{m}$) (Riisgard and Larsen, 2010). Thus, mussels may accumulate BMAA from diatoms as well as from zooplankton. This hypothesis is supported by the occurrence of BMAA in fractions of plankton dominated by either diatoms or zooplankton. BMAA has already been reported in zooplankton, in 6-fold higher concentrations than in cyanobacterial samples from the Baltic Sea, suggesting a bioaccumulation through feeding processes (Jonasson et al., 2010). This bioaccumulation may have also occurred in Thau lagoon as zooplankton is assumed to feed on microalgae and some dinoflagellate and diatom species present in this ecosystem are reported to contain BMAA.

In view of our results confirming the presence of BMAA in cultured diatoms, periphyton and seston sampled in Thau lagoon, we propose a theoretical bioaccumulation pathway within Thau lagoon based on accumulation from these three compartments (figure 31). Hitherto, only one study focused on bioaccumulation and depuration of BMAA in four freshwater mussel species (Downing et al., 2014). This study used isotopically labeled BMAA, yet could not provide any evidence of either degradation of BMAA nor incorporation into or association of BMAA with proteins. Thus, further work is required to better understand accumulation and metabolism of BMAA in mussels and to confirm the validity of the hypothesized BMAA bioaccumulation pathway in Thau lagoon.

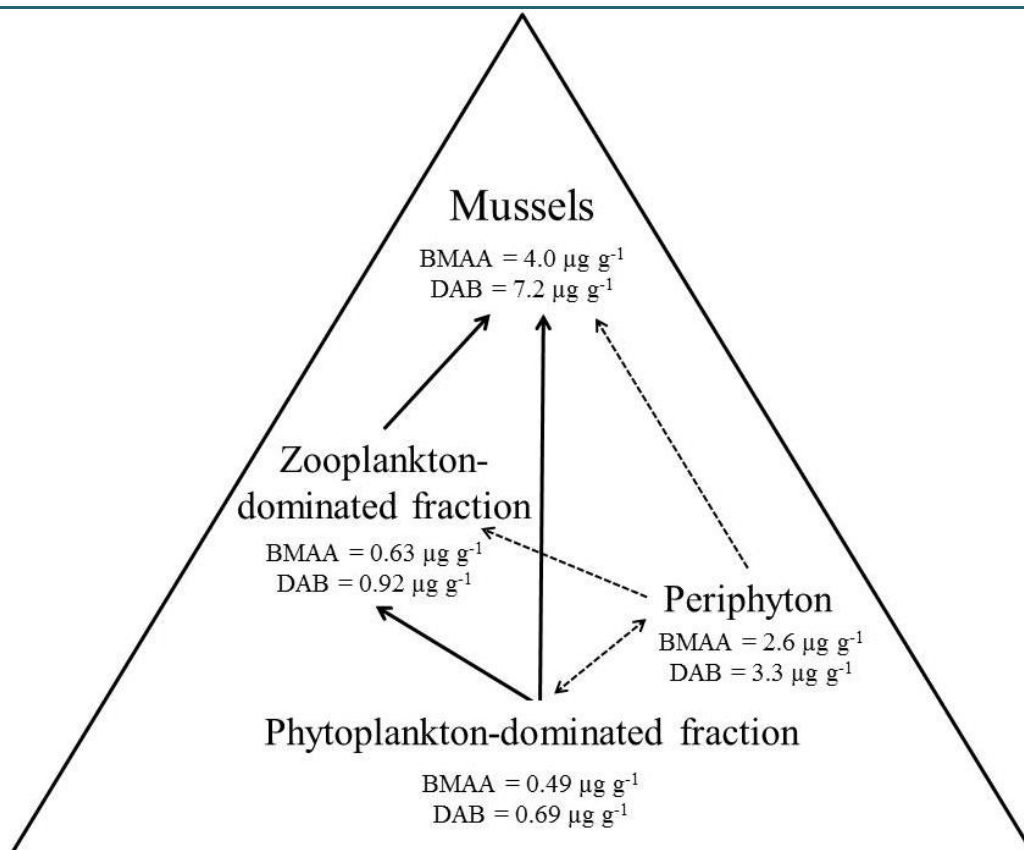


Figure 31: hypothesized bioaccumulation pathway within the Thau lagoon ecosystem. Mean concentrations of total BMAA and DAB are expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. The plain arrows represent the hypothesized trophic links while dotted arrows represent non-confirmed links.

3.6. Conclusions and perspectives

We performed a survey of different trophic compartments of the Thau lagoon ecosystem, including seston (phytoplankton and zooplankton), periphyton and mussels, between July 2013 and October 2014. BMAA, DAB and AEG were present in mussels at any time point through the year. Interestingly, bound forms of both BMAA and DAB were also detected in phytoplankton-dominated fractions, zooplankton-dominated fractions and periphyton, all representing possible food sources for mussels. The increase in BMAA and DAB between lower and higher trophic levels led us to hypothesize that bioaccumulation of BMAA and DAB occurs as a result of feeding processes in mussels of Thau lagoon. The phytoplankton community of this ecosystem is dominated by diatoms, as confirmed by both the observation of the phytoplankton-dominated fractions and the REPHY surveillance program. This is of particular importance since diatoms have recently been suggested to produce BMAA and they sustain the growth of mollusks in Thau lagoon. Indeed, we confirmed through controlled cultures of diatoms in the laboratory that they may constitute a source of BMAA. In particular, we found BMAA in two out of

the three *Chaetoceros* species that were screened and this genus is frequently present in Thau lagoon at high concentrations. These results strengthened the hypothesis that diatoms are a major source of BMAA and that they are a likely source of BMAA in Thau lagoon. However, the sampling procedure of seston should be improved to collect specifically the different fractions of plankton (*i.e.* picophyto-, microphyto- and zooplankton) and to revise the bioaccumulation pathway of BMAA in the Thau lagoon ecosystem. In future, the direct accumulation of BMAA in mussels as a result of feeding on diatoms should still be confirmed in controlled contamination experiments.

Acknowledgment

This study was carried out under the RISALTOX project (Ifremer) and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. The authors would like to thank all of the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study, Michèle BARDOUIL, Virginie RAIMBAULT for the culture of some microalgal species, and Véronique SAVAR and Fabienne HERVE for their technical assistance. The authors would also like to thank Aurélie CHARRIER of the PBA laboratory, Ifremer, for providing some diatoms cultures.

3.7. Supplementary material

Figure 32: Free (empty symbols) and total (dark symbols) concentration in $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW for both digestive glands (DG, circle) and remaining flesh (RF, square) of (A) DAB and (B) BMAA in mussels collected in Thau lagoon between July 2013 and October 2014.

Table 17: Composition of the plankton community in seston collected with phytoplankton nets. Major species of diatoms, dinoflagellates and zooplankton were mentioned in brackets.

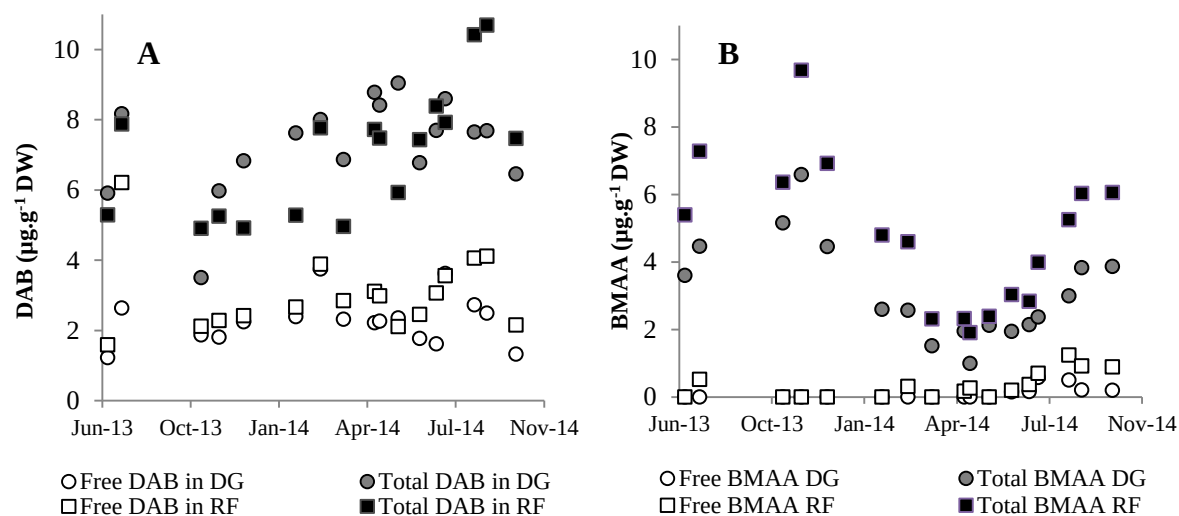


Figure 32 : free (empty symbols) and total (dark symbols) concentration in $\mu\text{g.g}^{-1}\text{ DW}$ for both digestive glands (DG, circle) and remaining flesh (RF, square) of (A) DAB and (B) BMAA in mussels collected in Thau lagoon between July 2013 and October 2014.

Date	Plankton > 20 μm and < 125 μm	Abundance	Plankton > 63 μm	Abundance
08-Jul-14	- 80 % diatoms (70% <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp., <i>Navicula</i> sp.) - 15% dinoflagellates (<i>Prorocentrum micans</i> , <i>Peridinium</i> sp.) - 5% zooplankton	+++	- 80% zooplankton (copepods) - 20% diatoms	++
18-Jul-14	- 90% zooplankton (tintinnids) - 5% dinoflagellates (<i>Peridinium</i> sp.) - 5% diatoms	++++	- 90% zooplankton (copepods) - 10% diatoms	++++
20-Aug-14	- 90% diatoms (45% <i>Chaetoceros</i> sp.) - 10% zooplankton (copepods)	+++	- 60% zooplankton (copepods) - 40% diatoms (<i>Chaetoceros</i> sp., <i>Navicula</i> , <i>Nitzschia</i>)	++
03-Sep-14	- 60% dinoflagellates (<i>Peridinium</i> sp. and <i>Prorocentrum</i> sp.) - 40% zooplankton (tintinnids)	++	- 99% zooplankton (copepods) - 1% diatoms	++++
06-Oct-14	- 85% diatoms (<i>Nitzschia</i> sp. and <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.) - 10% zooplankton - 5% dinoflagellates (<i>Prorocentrum</i> sp.)	+	- 60% zooplankton (copepods and tintinnids) - 40% diatoms (<i>Nitzschia</i> sp. and <i>Pseudo-nitzschia</i> sp.)	++

Table 17 : composition of the plankton community in seston collected with phytoplankton nets. Major species of diatoms, dinoflagellates and zooplankton were mentioned in brackets. Overall abundance was evaluated between low concentration (+) and bloom (++++), as an indication of the density of plankton organisms.

4. Contexte

Dans notre précédente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'occurrence de la BMAA dans certains compartiments de l'écosystème de Thau. Ainsi, nous avons rapporté la présence systématique de la BMAA et ses isomères dans les bivalves prélevés environ une fois par mois, sur plus d'une année entre juillet 2013 et octobre 2014.

De plus, nous avons découvert de la BMAA dans certaines souches de diatomées en culture. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisque les diatomées constituent une part importante de l'alimentation des mollusques filtreurs marins, dans l'étang de Thau, mais également sur le reste du littoral français.

Les résultats d'autres études rapportent que les dinoflagellés marins produiraient également de la BMAA [*i.e. Gymnodinium catenatum* et *Heterocapsa triquetra* (Lage et al., 2014 ; Jiang et al., 2014a)] augmentant ainsi le nombre d'espèces et de genres phytoplanctoniques producteurs.

5. Objectifs et approche méthodologique

Dans ce contexte, voici nos objectifs :

- évaluer la présence de BMAA dans des mollusques prélevés dans des zones de production de coquillages sur l'ensemble du littoral français métropolitain (*i.e.* en dehors de l'étang de Thau)
- étudier les éventuelles concordances entre les concentrations de BMAA dans les bivalves et les espèces phytoplanctoniques présentes dans leur environnement (e.g. diatomées, dinoflagellés, autres)
- poursuivre la culture et le criblage de microalgues constituant une possible ressource alimentaire pour les bivalves filtreurs

Pour y répondre, nous avons largement pu nous appuyer sur le REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) dont le fonctionnement est résumé sur la figure 33. Ce réseau national piloté par l'Ifremer a pour objectifs d'observer en routine l'ensemble des espèces phytoplanctoniques (*i.e.* flores totales) des eaux côtières et notamment celles produisant des toxines (e.g. *Dinophysis* spp., *Alexandrium* spp. et *Pseudo-nitzschia* spp.) et donc de quantifier ces toxines dans les mollusques bivalves provenant d'exploitations ou de gisements naturels.

En parallèle le REPHY a mis en place un système de vigilance mensuel des toxines dans les glandes digestives des bivalves (*i.e.* organes accumulant généralement les toxines) depuis 2012, pour répondre aux cas de toxicités atypiques et faire face aux éventuelles toxines émergentes (*i.e.* non réglementées ou nouvelles). Dans ce cadre, 10 zones sentinelles de référence ont été définies pour avoir une répartition homogène représentative des côtes françaises.

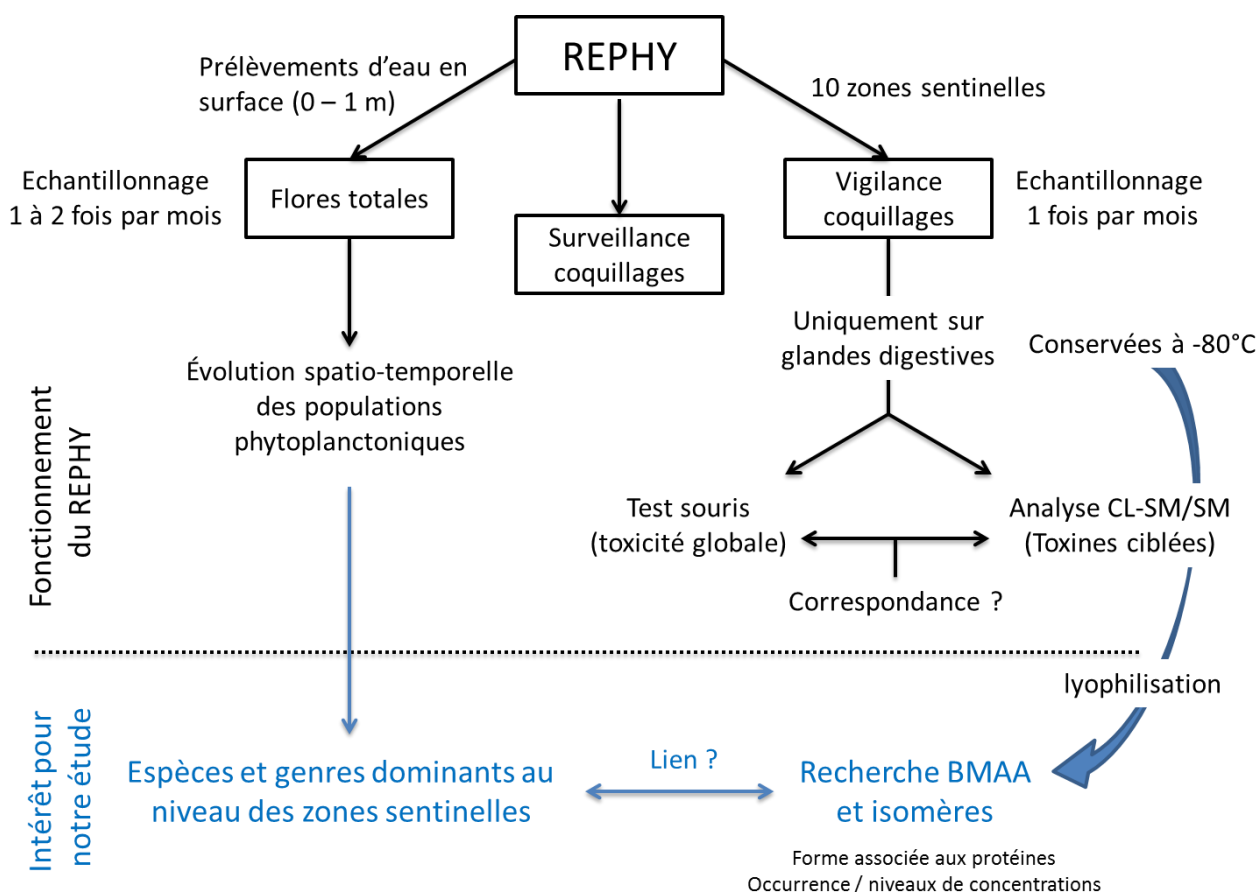


Figure 33 : description du fonctionnement du REPHY et son intérêt dans le cadre de notre étude.

Ainsi, nous avons pu cribler avec notre méthode HILIC-SM/SM une centaine d'échantillons collectés pendant l'année 2013 dans 9 des 10 zones sentinelles. La répartition géographique de ces zones correspond parfaitement à notre volonté d'évaluation de la présence de BMAA dans les mollusques marins couvrant l'ensemble du littoral français.

6. 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

Damien Réveillon, Véronique Séchet, Philipp Hess, Zouher Amzil

Article soumis à Toxicon le 14 septembre 2015.

6.1. Résumé

La neurotoxine β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) est naturellement présente dans plusieurs espèces de microalgues marines. L'accumulation de BMAA a largement été observée dans des bivalves filtreurs, qui se nourrissent des producteurs primaires situés à la base des chaînes alimentaires aquatiques. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'occurrence de BMAA et ses isomères dans des mollusques provenant de neuf zones de production de mollusques représentatives de l'ensemble du littoral français. L'utilisation d'une méthode HILIC-SM/SM très sélective et sensible, avec le D₅DAB comme standard interne a révélé la détection systématique de BMAA et DAB, en concentrations allant de 0,2 à 6,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec dans les glandes digestives des mollusques analysés. Alors que nous avons détecté de la BMAA dans quatre souches de diatomées dans une étude précédente, ici, seules des traces de BMAA ont été détectées dans une souche de diatomée parmi les 23 espèces de microalgues appartenant à 7 classes criblées. Les concentrations de BMAA et DAB dans les huîtres et les moules étaient globalement similaires malgré les différents lieux de prélèvements et la diversité des populations phytoplanctoniques auxquelles les bivalves ont été exposés. Seulement de faibles variations des teneurs de BMAA et DAB ont été notées, mais elles n'étaient corrélées à aucune des espèces phytoplanctoniques rapportées. Par conséquent, des efforts doivent être fournis concernant l'origine et la métabolisation de BMAA dans les mollusques. Les concentrations observées dans cette étude sont similaires à celles obtenues dans d'autres études en France et ailleurs. Une étude précédente a émis l'hypothèse d'un lien entre la présence de BMAA à ces concentrations dans des mollusques et un cluster significatif de sclérose latérale amyotrophique (SLA) dans le sud de la France. C'est pourquoi l'occurrence générale de BMAA dans des coquillages de toutes les côtes françaises rapportée dans cette étude suggère la nécessité de réaliser des études épidémiologiques et toxicologiques pour définir les concentrations représentant un risque via la consommation d'aliments contenant de la BMAA et le lien avec les maladies neurodégénératives.

6.2. Abstract

The neurotoxin β -*N*-methylamino-L-alanine (BMAA) is naturally present in some microalgal species in the marine environment. The accumulation of BMAA has widely been observed in filter-feeding bivalves that are known to consume primary producers constituting the base of complex aquatic food webs. This study was performed to assess the occurrence of BMAA and isomers in mollusks collected from nine representative shellfish production areas located on the three French coasts (Channel, Atlantic and Mediterranean sites). The use of a highly selective and sensitive HILIC-MS/MS method, with D₅DAB as internal standard, revealed the systematic detection of BMAA and DAB, in concentrations ranging from 0.20 to 6.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight of digestive gland tissues of mollusks. While we detected BMAA in four strains of diatoms in a previous study, only trace of BMAA was detected in one diatom species out of the 23 cultivated strains of microalgae, belonging to seven classes. The concentrations of BMAA and DAB in mussels and oysters were similar at different sampling locations and despite the high diversity of phytoplankton populations that mollusks feed on at these locations. Only small variations of BMAA and DAB levels were observed and these were not correlated to any of the phytoplankton species reported. Therefore, extensive research should be performed on both origin and metabolism of BMAA in shellfish. The levels observed in this study are similar to those found in other studies in France or elsewhere. A previous study had related such levels to a cluster of Amyotrophic Lateral Sclerosis in the South of France; hence the widespread occurrence of BMAA in shellfish from all coasts in France found in this study suggests the need for further epidemiological and toxicological studies to establish the levels that are relevant for a link between the consumption of BMAA-containing foodstuffs and neurodegenerative diseases.

Key words: BMAA, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Phaeodactylum*, bivalves, seafood

6.3. Introduction

BMAA (β -*N*-methylamino-L-alanine) is a non-proteinogenic amino acid whose mechanisms of toxicity have been extensively studied [reviewed by (Chiu et al., 2011; Karamyan and Speth, 2008)] and associated with neurodegenerative diseases like the particular form of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) that occurred on the island of Guam in the 1950s (Whiting, 1963).

To date, BMAA and isomers have been detected in many organisms encompassing microalgae, plants, mollusks, crustaceans and fishes, hence including potential foodstuffs (Al-Sammak et al., 2014;

Christensen et al., 2012; Cox et al., 2005; Lage et al., 2014; Mondo et al., 2012; Murch et al., 2004a). The bioaccumulation of BMAA, theoretically based on its misincorporation instead of L-serine during protein synthesis (Dunlop et al., 2013; Glover et al., 2014), has been suggested in geographically distinct aquatic food webs, in marine and fresh- or brackish water environments, e.g. Baltic Sea (Jonasson et al., 2010), Florida Bay (Brand et al., 2010), Gonghu Bay, China (Jiao et al., 2014) or Thau lagoon, France (Réveillon et al., 2015). Concentrations reported varied by several orders of magnitude, most likely originating from insufficient analytical performance that led to overestimation and/or misidentification of BMAA, as recently reviewed by (Faassen, 2014). Thus, the analysis of BMAA requires selective and sensitive analytical methods, relying on tandem mass spectrometry and the use of an internal standard for accurate quantification (Cohen, 2012). Considering only those studies in which highly selective methods have been employed, the widespread occurrence of BMAA in many organisms, including in primary producers like cyanobacteria, cannot be clearly verified (Faassen, 2014). However, recent reports convincingly showed the presence of BMAA in dinoflagellates and diatoms (Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014), expanding the number of BMAA-containing phytoplanktonic species that constitute the base of food chains.

Recreational activities as well as aerosolization have been highlighted as potential routes of human exposure to BMAA (Banack et al., 2010; Cox et al., 2009; Stommel et al., 2013). However, since the detection of BMAA in the diet of the Chamorro people on the island of Guam (Cox et al., 2003), the risk arising from the consumption of BMAA-containing foodstuffs has gained attention and could constitute a more widespread route of human exposure. Indeed, recent studies reported the existence of potential BMAA-contaminated foodstuffs, for a large Swedish population (Jiang et al., 2014b), in the environment where ALS clusters have been reported (Banack et al., 2015; Masseret et al., 2013) and even in the direct diet of ALS patients (Banack et al., 2014; Field et al., 2013). The accumulation of BMAA in the human brain is still under debate (Combes et al., 2014; Murch et al., 2004b; Pablo et al., 2009; Snyder et al., 2009), possibly due to different sample preparation techniques and analytical methods. Even though the presence of BMAA in the human central nervous system may be not specific to ALS-patients (Berntzon et al., 2015), the fact that humans are exposed to BMAA confirms that further studies are required about BMAA sources and its level of involvement in neurodegenerative disorders (Banack et al., 2015).

In France, BMAA had been detected in shellfish for the first time in Thau Lagoon, South of France (Masseret et al., 2013). Those authors also formulated the hypothesis that this contamination could be related to an ALS cluster in that area. However, many toxins produced by phytoplankton (*i.e.* phycotoxins) are accumulated in filter-feeding bivalves, including some neurotoxins currently not

regulated e.g. spirolides and pinnatoxins, leading to health concerns for consumers (Amzil et al., 2007; Amzil et al., 2008; Hallegraeff, 1993; Hess et al., 2013). In the context of the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network program (REPHY), shellfish from different locations on the French coasts are routinely screened for regulated toxins as well as fast acting phycotoxins while the phytoplankton communities are also recorded (Amzil et al., 2007; Belin and Neaud-Masson, 2012). In addition, the REPHY has established a vigilance program of shellfish for novel or emerging toxins, *i.e.* analysis by both LC-MS/MS (Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry) and the lipophilic mouse bioassay as a screen (Belin and Neaud-Masson, 2012).

In a previous study, we have reported the continuous presence of BMAA and isomers in mussels from Thau lagoon, French Mediterranean Sea (Réveillon et al., 2015). To assess whether BMAA was present in French ecosystems other than Thau lagoon, we screened 97 samples of mollusks (mussels and oysters) with a highly selective and sensitive HILIC-MS/MS method (*i.e.* liquid chromatography with a HILIC column). This method had previously been optimized for cyanobacterial and mollusk matrices, using D₅DAB as internal standard (Réveillon et al., 2014). The mollusks were sampled within the vigilance program, once a month during 2013, in nine locations chosen for geographical spread and to reflect important French shellfish production areas. Thanks to the phytoplankton communities (*i.e.* database of REPHY), we would be able to evaluate a possible link between phytoplankton populations and the concentration of BMAA in the mollusks, as was hypothesized between diatoms and the mussels of Thau lagoon in a recent study (Réveillon et al., 2015). In parallel, 23 microalgal species were screened for total BMAA and isomers, to assess if other species, in addition to the already analyzed diatoms and dinoflagellates, are capable of producing BMAA.

6.4. Material and Methods

6.4.1. Chemicals and reagents

β -N-methylamino-L-alanine hydrochloride (BMAA, B107) and trichloroacetic acid (TCA, 33731) were purchased from Sigma-Aldrich, France, while N-2-aminoethylglycine (AEG, A1153) and 2,4-diaminobutyric acid dihydrochloride (DAB, D0083) were obtained from TCI, Belgium. D-2,4-diaminobutyric acid-2,3,3,4,4-²D₅ dihydrochloride (D₅DAB), used as the internal standard, was purchased from CDN isotopes (CIL, France).

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained as HPLC grade solvents from JT Baker, France. Water for analysis was supplied by a Milli-Q integral 3 system (Millipore, France). Solutions of

formic acid (FA, 33015), hydrochloric acid 37% (HCl, 258148) and ammonium hydroxide (NH₄OH, 221228), all reagent grade, were purchased from Sigma-Aldrich, France.

6.4.2. Samples

6.4.2.1. Collection of shellfish as part of the vigilance surveillance program in 2013

Sampling was carried out in 2013 in nine of the ten sentinel sites defined by the vigilance surveillance program (figure 34), as part of the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network (REPHY). The site at Ingril was omitted since previous studies had already established the presence of BMAA in Thau lagoon, an adjacent production area (Masseret et al., 2013; Réveillon et al., 2015).

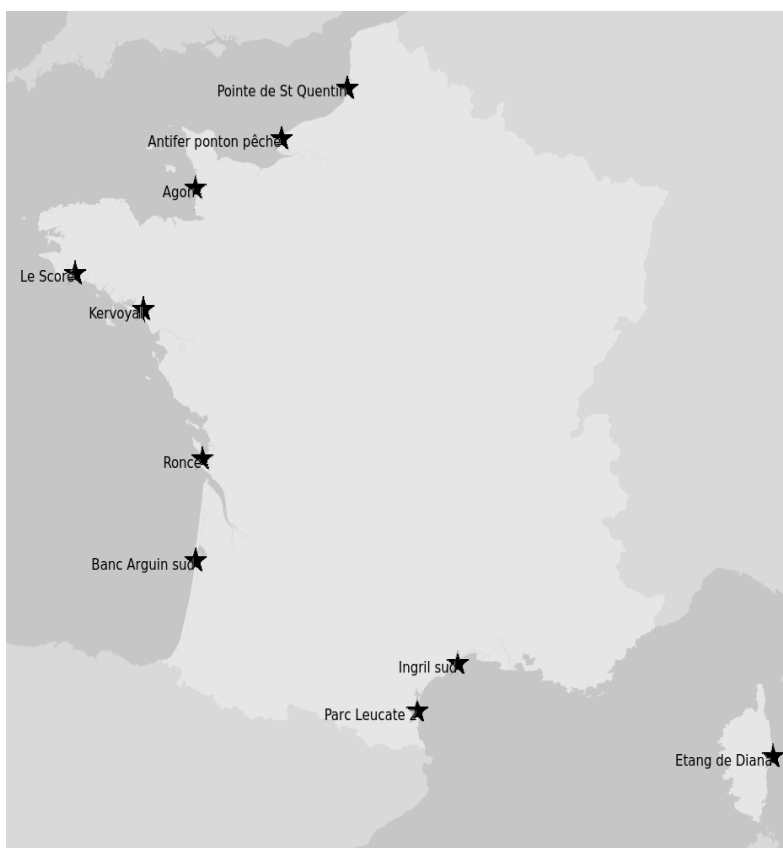


Figure 34: Map of French coastline with the ten sentinel sites selected for the vigilance surveillance program.

Digestive gland tissues (DG, ≥ 10 g) of either oysters (*Crassostrea gigas* in Ronce and Parc Leucate) or mussels (*Mytilus galloprovincialis* in Etang de Diana and *M. edulis* in all remaining sites) were collected once a month on each site, homogenized and stored at -80°C . It should be noted that all

sampling dates were available for only few sites (Le Scoré, Kervoyal, Ronce and Banc Arguin sud), while one date was missing for Pointe de St Quentin, Antifer ponton pêche, Agon and Parc Leucate and only 5 samples were available from Etang de Diana. In total, 97 freeze-dried aliquots, corresponding to nine sites, were screened. Only total BMAA and isomers were analyzed because the free form of these non-proteinogenic amino acids was rarely detected in previous studies (Al-Sammak et al., 2014; Réveillon et al., 2014), especially in digestive gland tissue of mollusks (Réveillon et al., 2015).

6.4.2.2. Monitoring of phytoplankton communities (REPHY)

The REPHY also monitors the spatial and temporal distribution of phytoplankton populations on French coasts. For quantitative analysis, sub-surface (0 – 1 m) water samples collected once or twice monthly were fixed with Lugol's solution and counted according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1958). Experts identified and counted all organisms $\geq 20 \mu\text{m}$. Smaller species were also counted if they were potentially toxic/noxious (e.g. *Chrysochromulina*, *Phaeocystis*) or had a chain structure or formed a colony. Organisms were identified to the lowest possible taxonomic level. Taxa that were difficult to discriminate with optical microscopy were grouped (e.g. *Pseudo-nitzschia* spp. or cryptophyceae species). Further details about sampling and processing of phytoplankton are available in the literature (Belin and Neaud-Masson, 2012; Gossel, 2006; Hernandez-Farinas et al., 2014). In this study, we used the phytoplankton population data of 2013, corresponding to the closest sampling sites to those of the mollusk sampling locations.

6.4.2.3. Microalgal cultures

Non-axenic strains of microalgae representing possible food resources for mollusks were cultured in order to screen them for the production of BMAA, DAB and AEG (table 18).

Alexandrium minutum AM99PZ, *Heterocapsa triquetra* HT99PZ and *Scrippsiella trochoïdea* ST97PZ were isolated from Bay of Morlaix, English Channel Sea, France. *Prorocentrum micans* PM85BV and the unidentified cryptophyceae were isolated from Bay of Vilaine while *Pseudo-nitzschia delicatissima* was isolated from Môle Saint-Anne, all from Atlantic Ocean, France. The other strains were coming from culture collections. The culture media were prepared with filter-sterilized seawater (0.2 μm) at a salinity of 35. Microalgae were grown in batch cultures (except *H. triquetra* in a 100 L bioreactor) and were harvested via centrifugation at 4000 *g* for 30 min at 4 °C. Supernatant was carefully discarded and the resulting pellet was freeze-dried, homogenized and stored at room temperature until extraction of total BMAA, DAB and AEG.

Table 18: Origin and conditions of culture of the microalgae species that were screened for total BMAA, DAB and AEG. The culture media were prepared accordingly to Guillard (1975) for f/2 medium, Guillard and Hargraves (1993) for L1 medium, Walne (1970) for Conway medium, Tompkins et al. (1995) for PE medium and Provasoli (1968) for ESP medium. For L1 modified medium, 190 μM of NaHCO_3 were added.

Strain	Origin	Culture media / days of growth (d)	Irradiance ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) / Light:dark cycle (h) / Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
Bacillariophyceae			
<i>Halamphora coffeaeformis</i>	CCAP 1001/2	f/2 / 18	200 / 12:12 / 20
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	CCMP 139	f/2 / 15	200 / 12:12 / 20
<i>Odontella aurita</i>	AC 815	f/2 / 22	200 / 12:12 / 20
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	France (P5C1)	L1 / 10	100 / 12:12 / 16
Dinophyceae			
<i>Alexandrium minutum</i>	France (AMP99PZ)	L1 (27%) - Si / 15	90 / 16:8 / 17
<i>Heterocapsa triquetra</i>	France (HT99PZ)	L1 - Si / (*)	250 / 16:8 / 20
<i>Prorocentrum micans</i>	France (PM85BV)	ESP / 19	100 / 12:12 / 16
<i>Pyrocystis noctulica</i>	CCMP 732	f/2 - Si / 34	200 / 12:12 / 20
<i>Scrippsiella trochoïdea</i>	France (ST97PZ)	f/2 - Si / 19	150 / 12:12 / 16
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	CCMP 828	f/2 - Si / 18	200 / 12:12 / 20
Cryptophyceae			
<i>Hemiselmis</i> sp.	RCC 659	L1 – Si (modified) / 12	100 / 16:8 / 17
<i>Proteomonas</i> sp.	RCC 3072	L1 – Si (modified) / 12	100 / 16:8 / 17
<i>Rhinomonas</i> sp.	RCC 821	L1 – Si (modified) / 12	100 / 16:8 / 17
<i>Rhodomonas salina</i>	RCC 1506	L1 – Si (modified) / 12	100 / 16:8 / 17
<i>Rhodomonas</i> sp.	RCC 1978	L1 – Si (modified) / 12	100 / 16:8 / 17
Unidentified cryptophyceae	France	L1 – Si (modified) / 12	100 / 16:8 / 17
Microalgae of other classes			
<i>Chlamydomonas reginae</i>	CCAP 11/78	Conway - Si / 20	200 / 12:12 / 20
<i>Chlorella vulgaris</i>	CCAP 211/25	Conway - Si / 20	200 / 12:12 / 20
<i>Dunaliella salina</i>	CCAP 19/18	f/2 - Si / 20	200 / 12:12 / 20
<i>Emiliana huxleyi</i>	CCMP 371	f/2 - Si / 27	200 / 12:12 / 20
<i>Eutreptiella gymnastica</i>	CCMP 1594	f/2 - Si / 20	200 / 12:12 / 20
<i>Porphyridium purpureum</i>	CCAP 1380/5	PE / 27	200 / 12:12 / 20
<i>Tisochrysis lutea</i>	CCAP 927/14	ESP / 27	50 / 12:12 / 16

(*) culture in a 100 L bioreactor; 27%, diluted natural seawater; - Si, without silicate

6.4.3. Sample extraction

BMAA, DAB and AEG (total form) were extracted and analyzed as previously described (Réveillon et al., 2014). Briefly, 750 μL of TCA 0.1 M containing the internal standard D_5DAB (50 ng mL^{-1}) were added to 10 mg (for algae) or 15 mg (for mollusk) of freeze-dried material before grinding with glass beads in a mixer mill (Retsch MM400, Germany) for 30 min. The supernatant was subsequently collected, evaporated to dryness, the residue dissolved in 600 μL HCl 6 M and hydrolyzed at 99 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. HCl was dried, and the residue dissolved in 1 mL of TCA 0.1 M before SPE clean-up on Bond Elut[®] Plexa PCX cartridges (Agilent Technologies, VWR, France).

6.4.4. Instrumentation and analytical method

Liquid chromatography was performed on a ZIC®-HILIC column (150 × 2.1 mm, 5 µm, Merck Sequant®) with a TSK gel amide 80 guard column (2 × 10 mm, 5 µm) using a Nexera Ultra-Fast Liquid Chromatography system (Shimadzu, France). Separation was achieved using a linear gradient elution at 0.2 mL min⁻¹ with a column temperature set at 30 °C while samples were kept at 4 °C and the injection volume was 5 µL. The elution program (solvent A: water and solvent B: acetonitrile, both with 0.1% formic acid) was as follows: 0 min, 37% A; 18 min, 55% A, 20 min, 55% A; 23 min, 37% A and 38 min, 37% A.

The MS/MS analysis was performed with an API 5500 QTRAP triple-quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, France) in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) detection. BMAA, DAB and AEG were unambiguously distinguished thanks to chromatographic resolution, specific mass spectral transitions and qualitative to quantitative ion ratios. The peak area ratio between the specific product ions m/z 76 and 88 was also verified for identification of BMAA. The common transition m/z 119 > 102 was used to quantify BMAA, DAB and AEG, while the transition m/z 124 > 47 was used to quantify D₅DAB. To avoid overestimation of BMAA in digestive gland tissues, BMAA was quantified with the specific transition m/z 119 > 88, for all mollusk samples (see paragraph 6.5.1).

Quantitation was performed relatively to pure standards of BMAA, DAB and AEG. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were the same as reported previously (Réveillon et al., 2014). For all isomers, LOQ was 0.23 µg g⁻¹ and 0.15 µg g⁻¹ DW for microalgae and mollusk matrices, respectively. A corrective factor derived from D₅DAB recovery was applied to compensate for losses during samples preparation and matrix effects. All other instrument parameters were the same as previously mentioned (Réveillon et al., 2014). The software Analyst 1.5.1 was used to analyze acquired raw data.

6.5. Results

6.5.1. HILIC-MS/MS performance

A compound eluting just before BMAA was detected in all digestive gland tissue of mollusks, especially for oysters extracts (Figure 37 supplementary material). In this study, the mean values (± RSD) of 88/102 and 76/102 ion ratios used for correct identification of BMAA were 13.2% (± 4.4%) and 12.1% (± 4.1%), respectively. These ratios were inconsistent between oyster digestive gland samples and the BMAA standard. These discrepancies were attributed to the interfering compound that only generated a

product ion at m/z 119 > 102. Therefore, the ratio of specific product ions (76/88) was assessed to further confirm BMAA identity. The 76/88 ion ratio of BMAA standard was $92.6 \pm 2.2\%$. For all mollusk extracts, there was a difference $\leq 10\%$ of this ratio between samples and the BMAA standard (with 93% of samples showing a difference $\leq 5\%$). Thus, the 76/88 ion ratio was included as a criterion used to confirm the identity of BMAA, in all biological matrices. The interfering compound could lead to an overestimation of BMAA since the mass spectral transition m/z 119 > 102 was used to quantify the samples. As an alternative, the quantification with either the product ion m/z 88 or 76 was tested and no difference was observed with these two ions for BMAA-calculated concentrations. Therefore, all digestive gland extracts of mollusks were quantified with the mass spectral transition m/z 119 > 88, for consistent comparison between oysters and mussels. As a function of this amendment, LOQs for BMAA in shellfish were somewhat higher than in the originally reported method (Réveillon et al., 2014), *i.e.* ($0.45 \mu\text{g g}^{-1}$ DW). Nevertheless, the signal-to-noise (S/N) ratio for the transition m/z 119 > 88 was ≥ 10 for all mollusks extracts, except for two oysters samples ($S/N \geq 6$).

In this study, the mean total recovery ($\pm$ RSD) of the internal standard D₅DAB was $62.6 (\pm 16\%, n=23)$ in microalgal samples, while recoveries of $64.9 (\pm 15\%, n=23)$ and $69.1\% (\pm 12.7\%, n=74)$ were obtained for digestive gland tissues of oysters and mussels, respectively.

6.5.2. BMAA and isomers in mollusks collected within the vigilance surveillance program

In total, 97 aliquots of digestive gland tissues of mollusks collected in 2013 were screened for BMAA and isomers. Surprisingly, BMAA and DAB were detected in all samples (both mussels and oysters), at all sampling stations and dates (figures 35 and 36). Mean BMAA concentrations (in $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, with the lowest and highest concentrations noted in brackets) were as follows: Kervoyal, 2.2 (0.52 – 6.7) < Antifer ponton pêche, 2.1 (1.1 – 3.4) < Agon, 1.7 (0.85 – 3.0) < Banc Arguin sud, 1.6 (0.82 – 2.9) < Pointe de St Quentin, 1.6 (0.76 – 2.8) < Diana, 1.0 (0.55 – 1.7) < Le Scoré, 0.78 (0.44 – 1.9) < Ronce, 0.76 (0.25 – 2.4) < Leucate, 0.61 (0.19 – 1.0). For DAB, the decreasing order was: Leucate, 7.5 (4.3 – 9.2) < Banc Arguin sud, 5.7 (2.8 – 7.2) < Diana, 4.9 (3.2 – 6.4) < Ronce, 4.8 (2.8 – 6.6) < Agon, 4.3 (2.3 – 7.2) < Kervoyal, 4.1 (2.0 – 7.9) < Le Scoré, 3.9 (2.5 – 7.9) < Antifer, 3.9 (1.9 – 6.2) < Pointe de St Quentin, 2.5 (1.2 – 4.6).

BMAA concentrations were generally higher in mussels, while for DAB, higher concentrations were observed in oysters (means of 1.6 *versus* 0.68 for BMAA and 4.2 *versus* 6.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW for DAB).

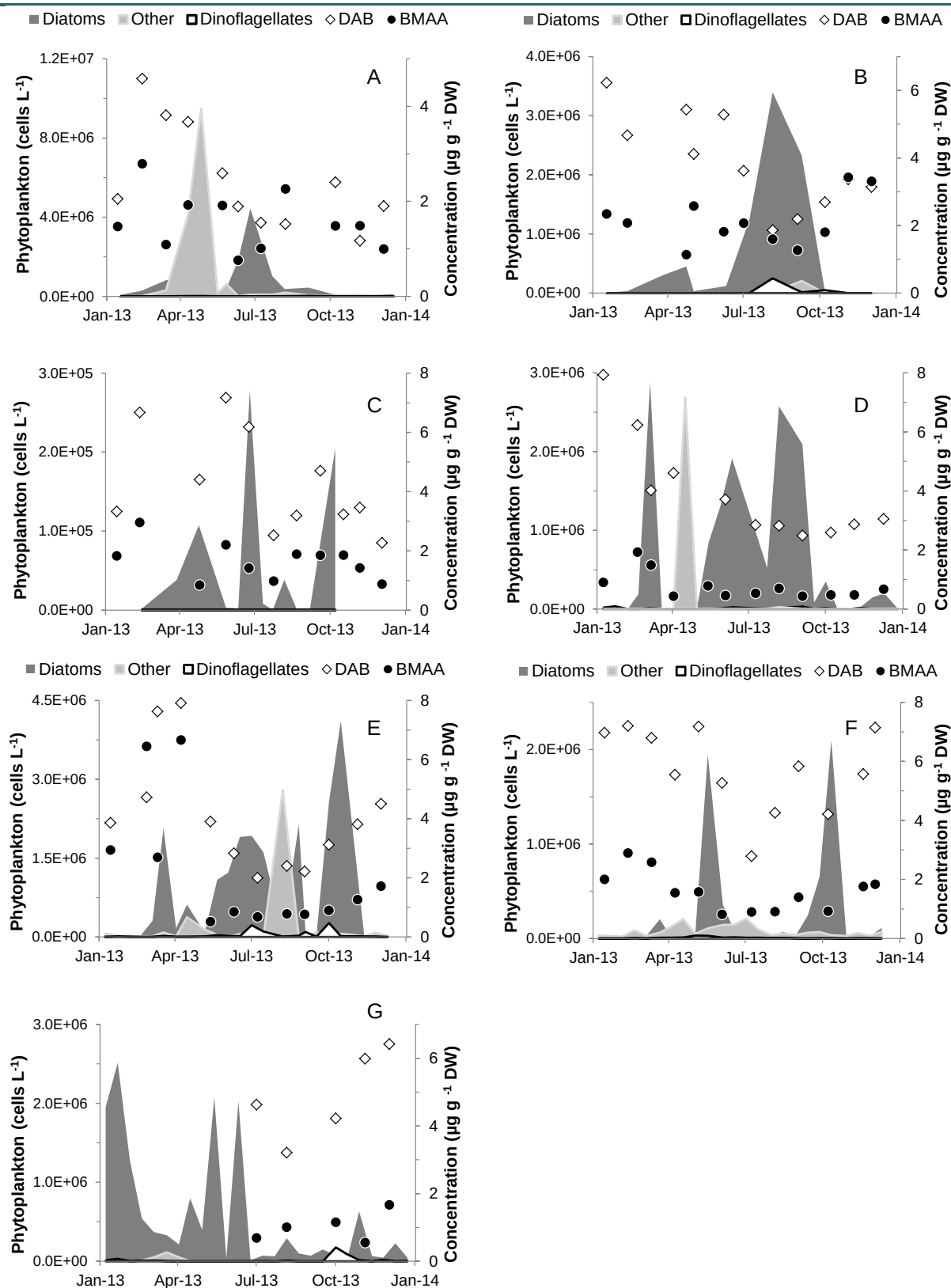


Figure 35: Abundances of diatoms, dinoflagellates and other classes of phytoplankton reported by REPHY in 2013 and BMAA and DAB concentrations obtained in the digestive glands of mussels sampled at (A) Pointe de St Quentin, (B) Antifer ponton pêche, (C) Agon, (D) Le Scoré, (E) Kervoyal, (F) Banc Arguin sud and (G) Etang de Diana, within the vigilance surveillance program. Only partial counting was available for Agon phytoplankton populations.

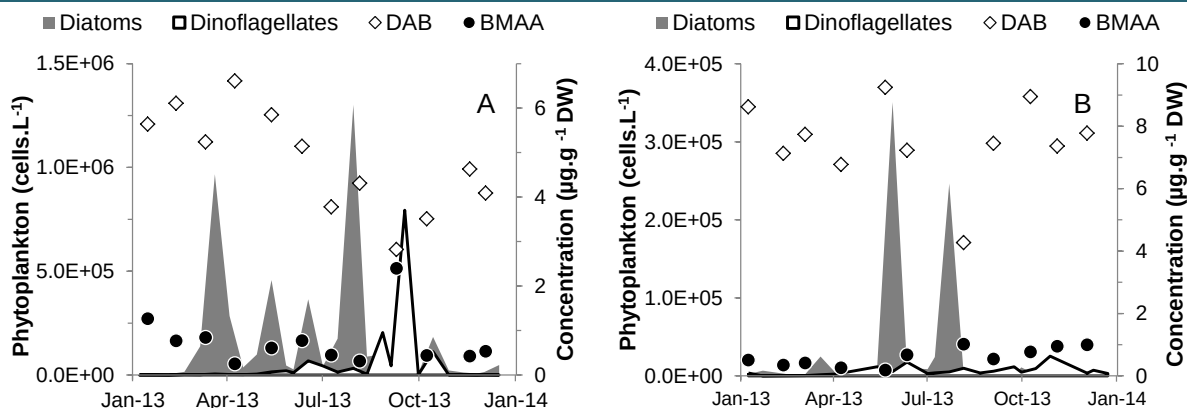


Figure 36: Abundances of diatoms and dinoflagellates reported by REPHY in 2013 and BMAA and DAB concentrations obtained in the digestive glands of oysters sampled at (A) Ronce and (B) Parc Leucate, within the vigilance surveillance program.

6.5.3. Phytoplankton populations database of REPHY

The phytoplanktonic populations at the sampling sites of REPHY varied both qualitatively and quantitatively during 2013 (table 19). Depending on the location, the number of identified taxa or groups of taxa ranged from 43 at Parc Leucate (Mediterranean lagoon) to 126 at Banc Arguin sud (entrance of the semi-enclosed Arcachon Bay). Diatoms and dinoflagellates represented the majority of observed taxa and diatom species were generally more diverse. The total abundance of phytoplankton cells was chosen as a proxy to estimate the quantity of food available for bivalve mollusks. Thus, phytoplankton relative abundance was low at Parc Leucate (< 1 million cells.L⁻¹), intermediate at Ronce, Antifer ponton pêche and Banc Arguin sud (5.6 – 8.5 million cells.L⁻¹) and high at the other sentinel sites (15 – 27 million cells.L⁻¹). Diatom abundances were significantly higher than dinoflagellate cell concentrations or other classes; except at Pointe de St Quentin where dense blooms of *Phaeocystis* sp. (prymnesiophyceae) were observed.

Table 19: Phytoplankton data (2013) of REPHY corresponding to the closest sentinel sites of the vigilance surveillance program. The number of identified taxa/groups, the proportion (qualitative and quantitative) of major classes, the total abundance and the most abundant species were reported. Only partial phytoplankton counting was available for Agon (adjacent to Antifer) thus the results were not included.

Sentinel site (distance between phytoplankton and mollusk sampling sites)	Number of identified taxa (% of diatoms/ dinoflagellates /other classes)	Total abundance of phytoplankton in 2013 (cells.L ⁻¹)	Proportion of major classes (% of total abundance) ■ = diatoms; ■ = dinoflagellates; ■ = other classes	Most abundant species (% of total abundance)
Pointe de St Quentin (8 km)	87 (65/25/10)	27 million		<i>Phaeocystis</i> (51%) <i>Leptocylindrus danicus</i> (25%)
Antifer ponton pêche (2.5 km)	63 (62/27/11)	8.5 million		<i>Chaetoceros</i> spp. (64%) <i>Leptocylindrus</i> spp. (14%)
Le Scoré (6 km)	110 (51/42/7)	16 million		<i>Chaetoceros</i> spp. (19%) Cryptophyceae (17%) <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> complex (15%) <i>Skeletonema costatum</i> (15%)
Kervoyal (8 km)	105 (53/36/11)	25 million		<i>Leptocylindrus</i> spp. (41%) Cryptophyceae (15%) <i>Chaetoceros</i> spp. (13%)
Ronce (2 km)	93 (67/28/5)	5.9 million		<i>Skeletonema</i> spp. (25%) <i>Leptocylindrus</i> spp. (24%) Gymnodiniaceae (20%)
Banc Arguin Sud (5 km)	126 (44/44/12)	8.2 million		<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> complex (41%) Cryptophyceae (21%) <i>Leptocylindrus</i> spp. (20%)
Parc Leucate (0 km)	43 (47/47/7)	0.87 million		<i>Chaetoceros</i> spp. (68%) <i>Prorocentrum</i> spp. (7%)
Etang de Diana (0 km)	76 (41/46/13)	15 million		<i>Nitzschia longissima</i> (45%) <i>Leptocylindrus minimus</i> (34%)

In 5 out of the 8 sites, the sum of abundances of *Chaetoceros* spp., *Leptocylindrus* spp., *Skeletonema* spp. and species of both *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex and cryptophyceae accounted for 69 to 84% of the total abundance of phytoplankton. At the other sites, *Phaeocystis*, *Nitzschia longissima* (diatom) and species of Gymnodiniaceae (dinoflagellates) were more abundant. It should be noted that the water sampling sites for phytoplankton monitoring were sometimes distant

from the sampling sites of mollusks for the vigilance surveillance program. However, they were chosen to be representative of phytoplankton communities in the surrounding area (including the bivalve production areas).

6.5.4. BMAA and isomers in lab-cultured microalgae

Some diatom and dinoflagellate species have recently been shown to contain bound BMAA in the marine environment (Jiang et al., 2014a; Jiang and Ilag, 2014; Lage et al., 2014; Réveillon et al., 2015). Therefore, we screened 23 species of marine microalgae to assess if other phytoplanktonic species contained BMAA, including 4 species of bacillariophyceae and 6 species of dinophyceae but also other classes that have not been screened so far, *i.e.* 6 species of cryptophyceae, 3 of chlorophyceae, 2 of prymnesiophyceae and one of both euglenophyceae and rhodophyceae (table 20).

Several microalgal species screened in this study were observed in different phytoplankton communities within the framework of the REPHY phytoplankton monitoring. While most species were only present at small cell concentrations, others were observed at much higher concentrations, *i.e.* *Prorocentrum micans*, *Asterionellopsis glacialis*, *Scrippsiella* spp. and the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (blooms of 170 000 to 2 million cells.L⁻¹). BMAA was not quantified in any of these 23 additionally screened microalgal species. However, a trace of BMAA (confirmed by injecting twice the regular volume) was observed in the diatom *Halamphora coffeaeformis*, another globally distributed common diatom. Two of the known isomers of BMAA, namely DAB and AEG, were respectively found in all microalgae (0.42 - 5.1 µg g⁻¹ DW) and in 9 (0.23 - 2.1 µg g⁻¹ DW) out of the 23 lab-cultured species.

Table 20: Concentrations of total form of BMAA, DAB and AEG in the lab-cultured microalgae. The presence of similar species observed within the framework of REPHY is mentioned as well as the number of sites in which the species were counted.

Strain	Species observed within REPHY	Concentration (µg g ⁻¹ DW)			Study
Bacillariophyceae		BMAA	DAB	AEG	
<i>H. coffeaeformis</i> (CCAP 1001/2)	No	Trace	0.66	0.25	This study
<i>A. glacialis</i> (CCMP 139)	Yes (n=8)	< LD	2.9	0.6	
<i>Odontella aurita</i> (AC815)	Yes (n=6)	< LD	5.1	0.35	
<i>P. delicatissima</i> (P5C1)	Yes (n=7)	< LD	3.5	< LD	
<i>C.calcitrans</i> (CCMP 1315)	Genus *	0.32	3.9	< LD	Réveillon et al., 2015
<i>Chaetoceros</i> sp. (France)	Yes (n=8)	0.58	29	< LD	
<i>P. tricornutum</i> (CCAP 1055/1)	No	0.51	1.3	< LD	
<i>T. pseudonana</i> (CCMP 1015)	Family **	0.75	18	< LD	
Dinophyceae		BMAA	DAB	AEG	This study
<i>A. minutum</i> (AMP99PZ)	Yes (n=8)	< LD	0.63	< LD	
<i>H. triquetra</i> (HT99PZ)	Yes (n=7)	< LD	5.1	< LD	
<i>P. micans</i> (PM85BV)	Yes (n=8)	< LD	1.2	2.1	
<i>P. noctulica</i> (CCMP 732)	No	< LD	5.0	0.23	
<i>S. trochoïdea</i> (ST97PZ)	Yes (n=8)	< LD	1.5	< LD	
<i>S. microadriaticum</i> (CCMP 828)	No	< LD	1.1	< LD	
Cryptophyceae		BMAA	DAB	AEG	
<i>Hemiselmis</i> sp. (RCC 659)	Yes (but grouped as Cryptophyceae)	< LD	3.9	< LD	
<i>Proteomonas</i> sp. (RCC 3072)		< LD	0.45	< LD	
<i>Rhinomonas</i> sp. (RCC 821)		< LD	0.9	< LD	
<i>R. salina</i> (RCC 1506)		< LD	1.1	< LD	
<i>Rhodomonas</i> sp. (RCC 1978)		< LD	0.85	< LD	
Unidentified cryptomonad (France)		< LD	1.7	< LD	
Microalgae of other classes		BMAA	DAB	AEG	
<i>C. reginae</i> (CCAP 11/78)	No	< LD	0.95	0.66	
<i>C. vulgaris</i> (CCAP 211/25)	No	< LD	3.5	0.76	
<i>D. salina</i> (CCAP 19/18)	No	< LD	3.1	< LD	
<i>E. huxleyi</i> (CCMP 371)	No	< LD	1.6	< LD	
<i>E. gymnastica</i> (CCMP 1594)	Yes (n=4)	< LD	2.6	< LD	
<i>P. purpureum</i> (CCAP 1380/5)	No	< LD	0.42	0.29	
<i>T. lutea</i> (CCAP 927/14)	No	< LD	2.7	< LD	

< LD: no peak or a peak inferior to the limit of detection ($0.23 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) was observed at a retention time corresponding to the standard; * as *Chaetoceros* sp.; ** as *Thalassiosira* sp. or *Thalassiosira* + *Porosira*.

6.6. Discussion

To date, at least three isomers of BMAA [*i.e.* DAB, AEG and BAMA (β -amino-*N*-methyl-alanine)] have been reported in different matrices including microalgae and mollusks (Banack et al., 2012; Jiang et al., 2013; Rosen and Hellenas, 2008). Thus, the chemical analysis of BMAA is challenging (Faassen, 2014; Faassen et al., 2012) and requires highly selective and sensitive methods to distinguish all analogs (Cohen, 2012; Combes et al., 2013; Jiang et al., 2013). In the present study, we used an HILIC-MS/MS method that had been optimized in a previous study (Réveillon et al., 2014). This method allowed us to unambiguously identify and accurately quantify BMAA, DAB and AEG in microalgae and mollusk matrices, using D₅DAB as internal standard.

Previously, we had reported the existence of a compound eluted just before BMAA in hydrolyzed mollusk samples (Réveillon et al., 2014). In this study, that interfering compound was, as expected, detected in the digestive gland tissues of mollusks (Appendix). As an alternative and to cope with the possible misidentification of BMAA, the ratio of specific product ions m/z 76/88 was successfully used to confirm BMAA identity in mollusk extracts and therefore applied to all biological samples. The quantification of BMAA with the product ion m/z 88 prevented any overestimation as no interfering compound was detected for the mass spectral transition m/z 119 > 88. Both the mean total recovery of D₅DAB and the relative standard deviations were similar to previous studies (Jiang et al., 2013; Réveillon et al., 2014). Finally, correct retention times, satisfactory ion ratios and reproducible extraction recoveries indicated adequate performance of the sample preparation and reliability of the analytical procedure.

According to the 2008-2009 data from the French national shellfish farming committee (CNC, 2010), France is the second European shellfish producer (up to 200 000 t annually, 65% of oyster *C. gigas*). To date, BMAA had only been screened in mollusks from Thau lagoon in France (Masseret et al., 2013; Réveillon et al., 2014), even though this production area accounts only for ca. 8% of the French production of shellfish (CNC, 2010). Samples of mussels and oysters collected monthly in 2013 as part of the vigilance program were analyzed to assess the distribution of BMAA in other shellfish production areas. These samples corresponded to nine geographically representative French shellfish growing areas and were analyzed for total BMAA and analogs. BMAA and DAB were always detected while AEG was observed in 88% of the mollusk samples. Concentrations of BMAA reported in this study are very similar to the concentrations that have been reported in mollusks worldwide (Table 21), considering only highly selective methods (*i.e.* no fluorescence detection).

Table 21: BMAA levels in bivalve mollusks used in this study and in previous articles

Organism	Origin	Total BMAA concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	Reference
Oyster (<i>Crassostrea virginica</i>) (n=15)	Louisiana and Mississippi	6.8 – 47	Christensen et al., 2012
Mussel (<i>Mytilus edulis</i>) (n=3) <i>Ostrea edulis</i> (n=3)	West coast of Sweden, Baltic Sea*	0.15 – 0.2 0.006 – 0.14	Jonasson et al., 2010
Mussel (<i>Mytilus edulis</i>) (n=6) Oyster (<i>O. edulis</i> or <i>C. gigas</i>) (n=4)	West coast of Sweden, Baltic Sea and imported from Greece and France	0.40 – 4.5** 0.50 – 3.3**	Jiang et al., 2014b
Cockle (<i>Cerastoderma edule</i>) (n=19)	Rias de Aveiro and Formosa, Portugal	< LD – 0.43	Lage et al., 2014
Mussel (<i>M. galloprovincialis</i>) (n=7) Oyster (<i>C. gigas</i>) (n=5)	Thau lagoon, France	1.8 – 6 0.60 – 1.6	Masseret et al., 2013
DG ^a of mussel (<i>M. galloprovincialis</i>) (n=17) RF ^b of mussel (n=17)	Thau lagoon, France	1.0 – 6.6 1.2 – 9.7	Réveillon et al., 2015
Mussel (<i>M. edulis</i> or <i>galloprovincialis</i>) (n=74) Oyster (<i>C. gigas</i>) (n=23)	French coasts (Channel, Atlantic and Mediterranean sites)	0.44 – 6.7 0.19 – 2.4	This study

* Fully marine ecosystem; ** concentrations expressed originally in $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight thus estimated here assuming that the dry/wet weight ratio is 0.2 for bivalve mollusks (Jiang et al., 2014b). ^a Digestive Gland and ^b Remaining Flesh.

Within the vigilance program, only the digestive gland tissues of mollusks are conserved as they are known to more efficiently accumulate toxins (Blanco et al., 2007; Jauffrais et al., 2012; Lassus et al., 2007). However, significant amounts of BMAA (*i.e.* $60 \pm 6.2\%$) have been detected in non-visceral tissue of *Mytilus galloprovincialis* from Thau lagoon (Réveillon et al., 2015) suggesting that total concentration of BMAA in the whole tissue of mollusks could be higher than those reported in the present study. It seems that BMAA presence is widespread among filter-feeding bivalves. Indeed, almost all studies reported shellfish to contain BMAA (and isomers, when included in the analysis), except some burrowing bivalves [*i.e.* *Cerastoderma edule* sampled from Portuguese transitional water bodies and from the Baltic Sea (Lage et al., 2014)]. The feeding behavior of shellfish has been suggested to explain the apparently global observation of BMAA in these organisms (Jiang et al., 2014b; Lage et al., 2014). Actually, as filter-feeding bivalves, shellfish are known to concentrate phycotoxins (Amzil et al., 2007; Jauffrais et al., 2012; Lassus et al., 2007), bacterial or viral particles (Cavallo et al., 2009; Le Guyader et al., 2006; Love et al., 2010) as well as chemicals (Chu et al., 2003; Jeon et al., 2010; Ueno et al., 2010) during the process of filter-feeding. Therefore, they may accumulate BMAA and isomers from ingested organisms. The reported BMAA producers include species of some ubiquitous phytoplankton classes that are largely represented on the French coast, *i.e.* species belonging to diatoms and dinoflagellates (Jiang et al.,

2014a; Lage et al., 2014; Réveillon et al., 2015). These primary producers are at the base of aquatic food webs and assumed to constitute the major food source for bivalve mollusks.

BMAA was systematically detected in French mollusks but specific patterns (*i.e.* cycles of accumulation/depuration) were not obvious. The BMAA level was not correlated to total or specific classes of phytoplankton abundances (figures 35 and 36). Indeed, similar BMAA concentrations were observed at locations with contrasted abundances of phytoplankton, *e.g.* between “Pointe de St Quentin” and “Banc Arguin sud” for mussels or between “Ronce” and “Parc Leucate” for oysters. The phytoplankton communities observed in the water samples were composed of species that mollusks can feed on (Brown et al., 1997; Dunstan et al., 2005; Fernandes et al., 2013; Ren et al., 2006), even though *Phaeocystis* and *Leptocylindrus* spp. may have less significance as food sources when blooming (Lauringson et al., 2014a; Peperzak and Poelman, 2008; Smaal and Twisk, 1997). Several hypotheses could explain the absence of correlation between phytoplankton and BMAA concentration in digestive gland of mollusks. Firstly, phytoplankton communities observed within REPHY are restricted to the cells $\geq 20\mu\text{m}$ present at sub-surface (0 – 1m) and sampled at distances up to several kilometers away from the location of mollusk sampling. Thus the observed phytoplankton populations may not be totally representative of the food directly available for mollusks. Furthermore, different feeding behavior depending on the season, type and abundance of plankton have been reported (Kreeger and Newell, 2001; Marín Leal et al., 2008; Wong and Levinton, 2004). Actually, the composition of stomach contents of mussels may not reflect the occurrence and abundance of phytoplankton communities (Rouillon et al., 2005; Sidari et al., 1998). For example, in the Baltic Sea, *Mytilus trossulus* never consumed *Leptocylindrus*, yet the most abundant genera in the water column while most of the benthic diatoms consumed appeared not to be present in simultaneously taken water samples (Lauringson et al., 2014b). This selective feeding behavior (Shumway et al., 1985) strengthens the possibility that the observed phytoplankton communities may not well represent the diet of mussels and oysters. In spite of their similar feeding processes and capacity for particle selection (Riisgard and Larsen, 2010), oysters appeared capable of greater trophic plasticity than mussels (Dubois et al., 2007) which may at least partly explain some differences in BMAA and DAB levels between these two shellfish species. Finally, bivalves are opportunistic filter-feeders thus, additional sources that are not sampled by REPHY cannot be excluded, *i.e.* microphytobenthos, aggregated bacteria, detritus (microalgal or terrestrial) and zooplankton (Kach and Ward, 2008; Lefebvre et al., 2009; Page and Lastra, 2003; Peharda et al., 2012; Pernet et al., 2014). Indeed, as suspension-feeding aquatic animals, bivalve mollusks have specialized in grazing on particles of a wide range of size (Riisgard and Larsen, 2010). Available studies using stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) and focusing on food webs of some ecosystems, in which mussels and oysters

were sampled in this study, revealed that mollusks preferentially consumed marine particulate organic matter, mainly composed of phytoplankton. However, microphytobenthos represented a significant proportion in most of the areas while terrestrial or riverine organic matter and detritus from macroalgae were less relevant (Carlier et al., 2009; Dubois et al., 2014; Lefebvre et al., 2009; Mortillaro et al., 2014; Riera and Richard, 1996; Rigolet et al., 2014). For example, in Lingreville near Agon, the area exhibited a high marine influence and the diet of mussels was composed of 70-90% of phytoplankton, with the rest consisting of half microphytobenthos and half riverine organic matter (Lefebvre et al., 2009). On the opposite, in Bay of Concarneau (near Le Scoré), mats of *Navicula* sp. (benthic diatoms consisting of epibionts) can contribute up to 50% to the diet of the suspension feeder *Polititapes virgineus* (Rigolet et al., 2014).

The number of recorded BMAA-producing and potentially producing species has increased over the past few years. In Thau lagoon, BMAA and DAB were detected in plankton collected with nets, indicating that mussels were exposed to organisms that contained both BMAA and DAB (Réveillon et al., 2015). However, specific species producing BMAA have not been identified in that ecosystem. Nevertheless, (Jiang et al., 2014a) hypothesized that BMAA production might be common among diatoms after they reported the detection of BMAA in five cultures of axenic diatoms species. We therefore assessed the capacity of some microalgae species, including diatoms, to contain BMAA. For this purpose, 23 microalgae belonging to seven classes were screened and if we consider the species analyzed in a previous study (Réveillon et al., 2015), a total of 38 species representing potential food sources for mollusks have been evaluated for their BMAA production. BMAA was only detected in 5 out of the 13 diatoms species ($0.32 - 0.75 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$) and only at trace level in microalgae in this study. None of the other species, independent of their classes, contained BMAA. The systematic detection of DAB and the observation of AEG in only some species (*i.e.* in 8 out of the 23 screened species) are in agreement with previous studies, suggesting that DAB is always detected in lab-cultured microalgae (Jiang et al., 2014a; Réveillon et al., 2015). Our results did not confirm the global production of BMAA by diatoms under our culture conditions. It is noteworthy that we did not detect BMAA in *Tisochrysis lutea* CCAP 927/14 (formerly *Isochrysis* aff. *galbana*) since it is frequently used in aquaculture to feed farmed bivalve mollusks (Marchetti et al., 2012). Even though we could not detect any BMAA in most of the microalgal species, further studies are required to better understand the conditions allowing the production of BMAA and isomers by primary producers, like the role of nitrogen (Downing et al., 2011; Scott et al., 2014). The absence of detectable BMAA in many cultured species that represent possible or important food sources for the mollusks raised questions about the origin of BMAA detected in the

shellfish. However, BMAA-producing species have not been clearly identified yet and due to the high diversity of potential primary producers that mollusks can feed on, as well as their trophic plasticity, there is a great uncertainty in determining which sources make important contributions to both their diets and BMAA content. In the future, particular attention should be paid to benthic diatoms belonging to microphytobenthos as they may represent a significant food source for mollusks.

According to Christensen et al. (2012), knowledge of the concentration and variability of BMAA in seafood species is essential for calculating human exposure and designing animal model studies for human risk assessment. The variation in BMAA and DAB levels in mollusks across the sampling sites and seasons was small in this study, and very similar to those reported by Jiang et al. (2014b) for different seafood sold in Swedish markets. However, only few studies reported the screening of BMAA in seafood on a relatively large scale (Christensen et al., 2012; Jiang et al., 2014b; Jonasson et al., 2010). The results of the present study highlight the fact that BMAA and DAB are continuously detected in both mussels and oysters that are farmed in different ecosystems along the three French coasts. Regarding these observations and the results obtained with mussels of Thau lagoon (Réveillon et al., 2015) BMAA accumulation and depuration might be slow processes. As non proteinogenic amino acid, BMAA exist in two forms, as a free amino acid and bound to proteins (Glover et al., 2014). However, the exact nature of molecular interaction between BMAA and proteins should be thoroughly studied to better understand both the mechanism of bioaccumulation and the metabolization by mollusks.

The results of the present study, outlining the widespread occurrence of BMAA in shellfish from all French mainland coasts, also contrast the hypothesis made by Masseret et al. (2013) of a potential correlation of the ALS cluster observed in Southern France and BMAA in shellfish from Thau Lagoon. We therefore strongly suggest to re-examine the causative agents for ALS in French patients and also to evaluate more closely the levels of BMAA in foodstuffs likely to trigger ALS.

6.7. Conclusion

This study was performed to assess the occurrence of BMAA and isomers in mollusks reared in nine representative bivalve farming areas located on the three French coasts (Channel, Atlantic and Mediterranean sites). Digestive gland tissues of mollusks were collected monthly in 2013 as part of the vigilance surveillance program of the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network (REPHY). A highly selective and sensitive HILIC-MS/MS method allowed the unambiguous identification and accurate quantification of BMAA in biological samples, using D₅DAB as internal standard. Despite

their different origins, mollusks were systematically shown to contain BMAA, DAB and to a lesser extent AEG. Considering only results obtained with highly selective methods, concentrations were similar to those reported worldwide in filter-feeding bivalves. However, small variations of BMAA and DAB levels were noted, irrespective of the season and sampling location. Thus no specific contamination pattern could be identified. Unlike for Thau lagoon, no correlation between phytoplankton population recorded and BMAA/DAB concentration in digestive glands was observed. However, diatoms and dinoflagellates species, some being reported as BMAA-producers, largely dominated the phytoplankton populations in the areas of the bivalve farming areas.

Finally, food web structures are complex and the primary producers containing BMAA and consumed by mollusks have not been totally identified yet. Further studies are required about the origin, accumulation and metabolization of BMAA and DAB in mollusks.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out under the RISALTOX project (Ifremer) and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire” through the PhD program (Damien Réveillon) and the COSELMAR project (Zouher Amzil, Philipp Hess and Véronique Séchet). The authors would like to thank all of the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study, especially Michèle Bardouil and Virginie Raimbault for the cultures of microalgae. They also would like to thank the members of Ifremer involved in the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network (REPHY) for all the data and samples available.

6.8. Supplementary material

Figure 37: Extracted ion chromatograms of BMAA, DAB and AEG of digestive gland tissues of (A) oyster from “Ronce” and (B) mussel from “Kervoyal”.

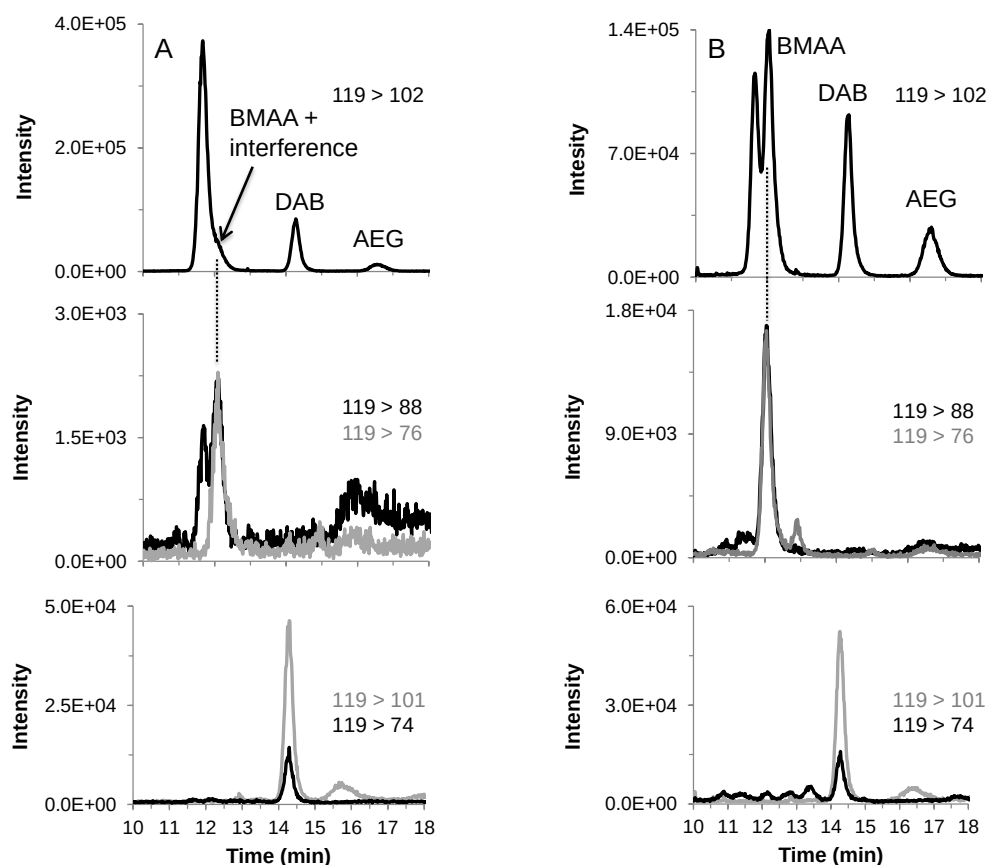


Figure 37: Extracted ion chromatograms of BMAA, DAB and AEG of digestive gland tissues of (A) oyster from “Ronce” and (B) mussel from “Kervoyal”. For the oyster sample, there is a co-elution between BMAA and an interfering compound leading to false ion ratios. However, the two peaks are partially resolved for mussel sample and the ion ratios are in agreement with those of the standards.

Chapitre 4 : Contamination de moules bleues avec une diatomée produisant de la BMAA

1. Contexte

La BMAA et ses isomères sont largement rapportés dans les organismes aquatiques (tableau 10). Cette tendance est confirmée par nos deux précédentes études qui révèlent la présence continue de ces trois analytes (BMAA, DAB et AEG) dans l'ensemble des mollusques prélevés sur le littoral français que nous avons analysés. Pourtant, ces quelques 115 échantillons correspondent à 10 zones différentes, soumises à diverses conditions environnementales (e.g. type de masse d'eau, diversité phytoplanctonique, conditions climatiques) et différents organismes (*i.e.* moules et huîtres).

Jusqu'à présent dans la littérature, l'accumulation de BMAA dans les organismes aquatiques était imputée aux cyanobactéries, en raison de leur ubiquité. Dans les eaux côtières, les cyanobactéries ne constituent pas une ressource alimentaire importante pour les bivalves, à l'inverse des diatomées et dinoflagellés. En France, les diatomées peuvent avoir contribué à la présence de BMAA dans les moules de Thau mais nous n'avons pas observé de lien évident entre les genres phytoplanctoniques présents dans/proches des 9 autres zones de production et les concentrations de BMAA retrouvées dans les glandes digestives des mollusques (*cf.* article précédent).

Ainsi, l'accumulation de BMAA dans les organismes aquatiques, dont les mollusques, a toujours été indirectement suggérée jusqu'à maintenant, d'autant plus que son mécanisme de bioaccumulation n'est pas élucidé (bien que l'incorporation dans les protéines ait été suggérée, *cf.* chapitre 1 paragraphe 2.7). Il est donc important d'étudier l'accumulation de BMAA dans un organisme aquatique, à la suite de son alimentation à partir d'une microalgue contenant de la BMAA.

Alors que la production de BMAA par les cyanobactéries est remise en question (*cf.* chapitre 1 paragraphe 2.8.2), certaines espèces de diatomées ont été confirmées productrices par des méthodes très sélectives. Jiang et al. (2014a) ont même caractérisé cette production de « constante au cours du temps » dans des cultures, à la différence de celle des cyanobactéries qui seraient « fluctuante ».

2. Objectifs et approche méthodologique

Les organismes aquatiques et surtout les bivalves filtreurs semblent continuellement contenir de la BMAA et ses isomères, que ce soit en France ou ailleurs (e.g. mer Baltique). Or, l'accumulation à partir de microalgues contenant ces molécules n'a jamais été prouvée, à l'inverse des autres interactions toxines-coquillages. Dans ce contexte, les objectifs ont été :

- étudier les cinétiques de production de BMAA et DAB dans 4 souches de diatomées marines
 - production constante comme suggéré par Jiang et al. (2014a) ?

- influence des bactéries sur la production de BMAA et isomères ?
- réaliser une contamination de moules bleues (*Mytilus edulis*) avec une diatomée produisant de la BMAA
 - comparaison moules non nourries, moules nourries avec *Phaeodactylum tricornutum* (contient BMAA) et *Tisochrysis lutea* (ne contient pas de BMAA)
 - voir figure 38 pour l'approche méthodologique

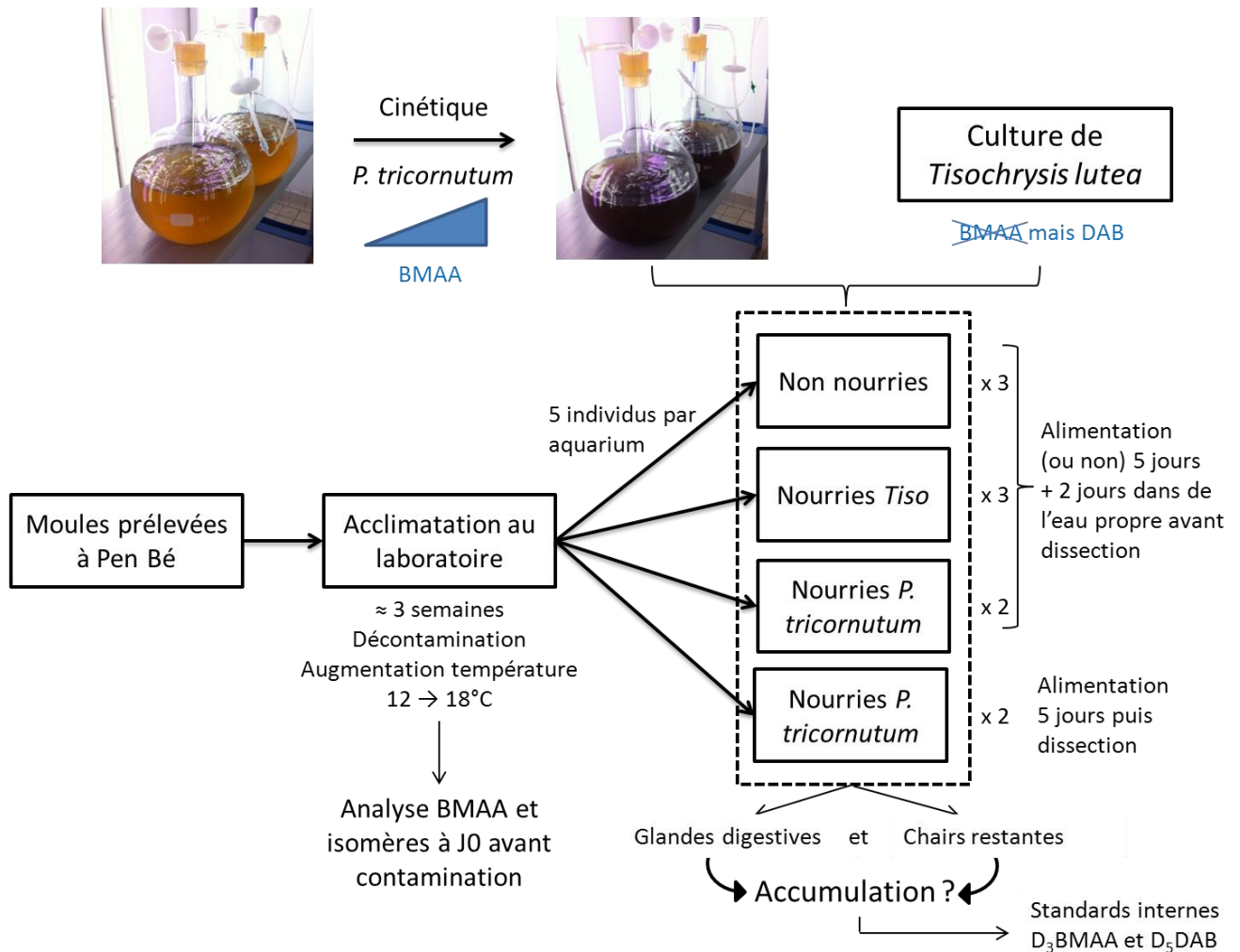


Figure 38 : approche méthodologique pour tenter de contaminer des moules avec *Phaeodactylum tricornutum*, une diatomée contenant de la BMAA.

3. BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid): production kinetics by four diatom species and contamination experiment of *Mytilus edulis*.

Damien Réveillon, Florence Mondeguer, Véronique Séchet, Philipp Hess, Zouher Amzil

Article en préparation, à soumettre dans Harmful Algae

3.1. Résumé

La β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) a naturellement été observée dans certaines microalgues. La présence cosmopolite de ces producteurs primaires a été associée aux rapports fréquents de BMAA dans les organismes marins filtreurs. En effet, ceux-ci se nourrissent de phytoplancton et peuvent accumuler les toxines que certaines espèces produisent. Cependant pour la BMAA, cette accumulation dans les organismes de niveaux trophiques supérieurs n'a jamais été montrée par une approche expérimentale. Dans cette étude, les cinétiques de production de BMAA et de son isomère le DAB (2,4-diaminobutyric acid) ont été suivies pour quatre espèces de diatomées (*i.e.* *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* et *Thalassiosira pseudonana*) productrices de BMAA. La production semble fonction des espèces mais les concentrations les plus élevées ont été obtenues pendant la phase stationnaire de croissance. Alors que du DAB a été détecté dans une espèce de bactérie isolée à partir d'une culture de *P. tricornutum*, les bactéries ne semblent pas influencer la production de BMAA et DAB par cette diatomée puisqu'aucune différence significative n'a été notée entre les concentrations obtenues pour les cultures traitées avec des antibiotiques et celle non traitée. Après l'étude de la production de BMAA par ces diatomées, nous avons réalisé au laboratoire une expérience de contamination de moules bleues avec une souche de *P. tricornutum* contenant de la BMAA. Une faible accumulation de BMAA a été quantifiée dans les tissus (*i.e.* glandes digestives et chairs restantes) des moules qui sont restées deux jours dans de l'eau propre après la fin de l'exposition au phytoplancton. Des processus métaboliques nécessaires à l'observation d'une accumulation peuvent avoir eu lieu durant cette période. Néanmoins, le bilan massique estimé n'explique pas entièrement l'augmentation de BMAA que nous avons détectée. Par conséquent, des travaux supplémentaires utilisant des durées d'exposition plus longues ainsi que des concentrations cellulaires plus importantes seraient nécessaires pour confirmer l'accumulation de BMAA dans les moules nourries avec une microlage contenant de la BMAA.

3.2. Abstract

β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) has naturally been observed in microalgae. The global presence of these primary producers has been associated to the widespread occurrence of BMAA in marine organisms. It is assumed that filter-feeding bivalves feed on phytoplanktonic species and accumulate many toxins produced by toxic microalgae. However, BMAA accumulation in higher trophic organisms has not been proven yet. In this study, kinetics of BMAA and DAB (2,4-diaminobutyric acid) production were observed for four diatom species (*i.e.* *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* and *Thalassiosira pseudonana*) that had previously been shown to contain BMAA with a highly selective HILIC-MS/MS method. The production seemed species-specific but the highest BMAA concentrations were measured during stationary growth phase. While DAB was detected in bacteria isolated from *P. tricornutum* culture, bacteria did not seem to influence BMAA and DAB production by this diatom species as no significant difference was noted between untreated culture and antibiotics-treated cultures. After the observation of BMAA production by diatoms, a five days contamination experiment of blue mussel was performed at the laboratory, with a *P. tricornutum* strain containing BMAA. A small accumulation was noted in both digestive gland and remaining flesh tissues of mussels that stayed two days in clean water after the end of the exposure. This 2-days duration may have allowed for metabolic processes required to obtain an observable accumulation. However, estimated mass balance could not fully explain the increase in BMAA contents. Therefore, extended contamination duration as well as higher abundance of cells should be used in further trials to confirm that *Mytilus edulis* are able to accumulate BMAA from ingested BMAA-containing microalgae.

Key words: BMAA, DAB, diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1, *Mytilus edulis*, contamination

3.3. Introduction

The non-proteinogenic amino acid β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) is a putative environmental factor involved in the etiology of amyotrophic lateral sclerosis-Parkinsonism dementia complex (ALS-PDC) (Spencer et al., 1987; Banack et al., 2010a). This specific neurodegenerative disease was observed on the Island of Guam in the 1950s and suspected to be linked to the consumption of BMAA-containing foodstuff (Murch et al., 2004a; Banack et al., 2006). Since the discovery of BMAA (Vega and Bell, 1967), the BMAA-ALS hypothesis is still under debate. However, it

has gained increased attention over the last decade from, in part, following observations. First, BMAA production has been reported in many different primary producers from both freshwater and marine environments. While cyanobacteria were the first organisms suspected to produce BMAA, some diatom and dinoflagellate species have recently been recognized as BMAA-producers as well (Cox et al., 2005; Jiang et al., 2013; Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014; Réveillon et al., 2015). Only few studies focused on the production of BMAA by primary producers. A group recently hypothesized that BMAA was always detected in five axenic diatom cultures while its production in cyanobacteria seem to be fluctuating (Jiang et al., 2014a). However, the phytoplanktonic species, including those containing BMAA, are at the base of food chains and their general presence in aquatic ecosystems might suppose a widespread exposure for aquatic organisms, through classic trophic interactions. Indeed, BMAA has been detected in a broad range of organisms worldwide, also in those representing possible foodstuff (Masseret et al., 2013; Jiang et al., 2014b; Jiao et al., 2014; Lage et al., 2014). Notably, BMAA was systematically detected in mussels and oysters sampled monthly over a year from ten bivalve farming areas located on the three French coasts (Réveillon et al., 201X in prep; Réveillon et al., 2015). While diatoms may have been a source of BMAA for mussels from the Mediterranean lagoon of Thau (Réveillon et al., 2015), no clear relationship was noted between BMAA in mollusks and phytoplankton population from the nine other French bivalves farming areas (Réveillon et al., 201X in prep). Hitherto, the accumulation of BMAA in higher trophic organisms like filter-feeding mollusks has only been indirectly suggested, except in a recent work (Baptista et al., 2015). Only two studies attempted to perform a contamination of filter-feeding organisms (*i.e.* *Daphnia magna* and *Mytilus galloprovincialis*) with BMAA-producing cyanobacterial strains. While no accumulation was observed for *D. magna* after two weeks of daily feeding with a *Synechocystis* sp. strain containing between 0.57 and 2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW BMAA (Esterhuizen-Londt et al., 2015), Baptista et al. (2015) reported accumulation of BMAA in Mediterranean mussels up to ca. 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW after 10 days, despite that only trace levels of BMAA were detected in the *Synechocystis salina* strain. The non-proteinogenic amino acid has been suggested to be incorporated into proteins during protein synthesis and bioaccumulated by this mechanism (Murch et al., 2004a). Nevertheless, even though free BMAA has been observed in filter-feeding organisms exposed to dissolved BMAA, incorporation into proteins was not detected or studied (Lüring et al., 2011; Downing et al., 2014; Baptista et al., 2015; Esterhuizen-Londt et al., 2015). All, the aforementioned observations suggest that accumulation and metabolization of BMAA may be more complex than supposed to date.

The aims of this study were first to observe kinetics of BMAA and isomers production in four diatom xenic cultures in which BMAA had previously been detected (Réveillon et al., 2015). As Jiang et al. (2014a) used axenic cultures when they reported BMAA in diatoms for the first time, the

influence of bacterial population on BMAA production was tested here after antibiotic treatments on *P. tricornutum* culture. Moreover, the production of BMAA and DAB by two bacterial colonies isolated from both *P. tricornutum* culture and the water containing mussels was assessed. Finally, a five days static contamination experiment of blue mussel fed BMAA (*i.e. Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1) and non-BMAA (*i.e. Tisochrysis lutea* CCAP 927/14) diets was performed. Indeed, BMAA accumulation from ingested BMAA-containing microalgae has to be proved in controlled conditions and diatoms are assumed to represent a significant part of mussels' diet in many ecosystems (e.g. in Thau lagoon, (Pernet et al., 2012)). All samples were analyzed using a highly selective and sensitive HILIC-MS/MS method (Réveillon et al., 2014). Both labeled D₃BMAA and D₅DAB internal standards were used to correct BMAA and DAB concentrations, thus allowing for further increase of both reliability and accuracy of the previously published method (Réveillon et al., 2014).

3.4. Material and Methods

3.4.1. Chemicals and reagents

β -N-methylamino-L-alanine hydrochloride (BMAA, B107) and trichloroacetic acid (TCA, 33731) were purchased from Sigma-Aldrich, France, while N-2-aminoethylglycine (AEG, A1153) and 2,4-diaminobutyric acid dihydrochloride (DAB, D0083) were obtained from TCI, Belgium. Deuterium labeled BMAA (BMAA-4,4,4-d₃, referred-to D₃BMAA, purity 98%), at a certified concentration of 1 mg.mL⁻¹ was purchased from Novakits (Nantes, France). Deuterium labeled DAB (D-2,4-diaminobutyric acid-2,3,3,4,4-d₅ dihydrochloride, referred-to D₅DAB, purity > 99%) was obtained from CDN isotopes (CIL, France).

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained as HPLC grade solvents from JT Baker. Water for analysis was supplied by a Milli-Q integral 3 system (Millipore, France). Solutions of formic acid (FA, 33015), hydrochloric acid 37% (HCl, 258148) and ammonium hydroxide (NH₄OH, 221228), all reagent grade, were purchased from Sigma-Aldrich, France.

3.4.2. Culture conditions of diatoms for the BMAA and DAB kinetic studies

Four diatom species were used for the kinetic experiments, namely *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1, *Chaetoceros* sp. isolated from Argenton, English Channel, France, *Chaetoceros calcitrans* CCMP 1315 and *Thalassiosira pseudonana* CCMP 1015.

Experiments were carried out using the Conway culture medium (Walne, 1970) at a temperature of 22 °C, an irradiance of 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and under a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark. The culture media were prepared in 10 L borosilicate round flasks with filter-sterilized seawater (0.2 μm) at a salinity of 35. At day 0, non-axenic starter cultures in mid-exponential growth phase were diluted in fresh medium (8 L) aerated with filtered air (0.2 μm), at a final concentration of ca. 150 000 cells.mL⁻¹. Cellular concentration was regularly assessed from day 0 to 31 by image analysis on Malassez slides using specific image analysis software (Samba Technologies, Meylan, France), after Lugol dying. The growth was also monitored by measuring fluorescence (excitation 450 nm and emission 685 nm) and absorbance (A_{680}) of chlorophyll with a TECAN Infinite® 200 Multi-Mode Microplate Reader and Tecan i-control 1.5.14.0 software.

For *Phaeodactylum tricornutum*, the experiment was performed in duplicate and cells were sampled 9 times between day 4 and 31. For the 3 other strains, single experiments were performed and the cells were sampled 8 times between day 4 and 31. Aliquots of 200 – 400 mL of cultures were harvested via centrifugation at 4000 *g* for 30 min at 4 °C. Supernatants were carefully discarded and the resulting pellets were stored at -20 °C until lyophilization.

3.4.3. Antibiotic treatments of *P. tricornutum* culture

To reduce bacterial community, the non-axenic culture of *P. tricornutum* was treated with a mixture of antibiotics. The penicillin-streptomycin solution (10 000 units penicillin and 10 mg streptomycin per mL, P0781, Sigma, France) was used at 15 and 30 mL.L⁻¹ on cultures in mid-exponential growth phase. After a 5 days treatment, the cultures were centrifuged twice 7 min at 500 *g* and once 10 min at 600 *g* then the procedure was fully repeated (*i.e.* antibiotics treatment, centrifugation and inoculation in fresh medium). The remaining bacterial population after the two antibiotic treatments was checked by growth on Marine Agar plates (Difco™ 2216). After the successful reduction of bacterial community, 500 mL of fresh autoclaved Conway medium were inoculated with both treated and untreated mid-exponential cultures of *P. tricornutum* at 150 000 cells.mL⁻¹. The growth was monitored with fluorescence and absorbance of chlorophyll. Cells were harvested at day 16 and analyzed in duplicate for BMAA and isomers content.

3.4.4. Isolation of bacterial colonies

In parallel, supernatant of *P. tricornutum* culture as well as seawater from cylindro-conical tanks containing mussels were deposited on Marine Agar plates. Single heterotrophic marine bacterial colonies obtained were inoculated in 400 mL of Marine Broth (Difco™ 2216) and agitated at

100 rpm. Bacteria were harvested as for microalgae after 11 days of growth and analyzed for BMAA and isomers.

3.4.5. Experimental contamination of blue mussels

3.4.5.1. Micro-algal cultures

Phaeodactylum tricornutum 8.6 (CCAP 1055/1; CCMP2561; strain Pt1) was chosen as a BMAA-containing diet because it is a “model” diatom whose whole genome has been sequenced (Bowler et al., 2008) and for practical reasons (*i.e.* ease of culture and counting). Culture was grown and monitored under the same conditions as previously described for the kinetic experiments. Cells from day 17 to 21 were used for the experimental contamination (*i.e.* beginning of stationary growth phase to have both satisfactory BMAA concentration and cellular integrity). BMAA and DAB were quantified at day 14, 18 and 24 to check the content of these two isomers in the *P. tricornutum* culture used to feed mussels.

Tisochrysis lutea (CCAP 927/14), a Prymnesiophyceae, was chosen as a non-BMAA diet as it is widely used for the production of larval and juvenile bivalves (Brown et al., 1997; Marchetti et al., 2012). *T. lutea* strain was grown in aerated batch culture (8 L) at 17 °C, with an irradiance of 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a light/dark cycle of 12:12 h and using ESP culture medium (Provasoli, 1968). Cellular concentration and growth were monitored as for *P. tricornutum*. Cells from day 7 to 11 were used for the contamination experiment. The BMAA content was assessed to be sure that *T. lutea* did not contain BMAA under the culture conditions performed in this study.

3.4.5.2. Maintenance of bivalves

Blue mussels (*Mytilus edulis*) were collected from a mussel farm in Pen Bé (French Atlantic coast) in February 2015 and transported alive to the laboratory. Mussels were cleaned and then maintained in two 128 L cylindro-conical tanks for 3 days to ensure adaptation to laboratory conditions, *i.e.* re-circulated natural seawater (35 psu) at 12 °C with aeration (*i.e.* airlift system). During the 20 days of acclimatization period prior to the experiment, the temperature was gradually increased from 12 to 18 °C. Seawater in the holding tanks was changed twice a week and any dead mussels were removed. Bivalves were unfed, thus allowing for food clearance from the digestive tract and decontamination. It should be noted that mussels spawned at the beginning of the acclimatization period, probably due to a higher temperature in the tanks in comparison to their natural environment. Five mussels from the cylindro-conical tanks were randomly selected for initial digestive gland (DG) and remaining flesh (RF) toxin analysis.

3.4.5.3. Experimental design

At the beginning of the feeding experiment, 50 randomly chosen mussels at shell lengths of 49 ± 3.2 mm were placed in 10 L aerated stainless steel aquariums (5 in each) filled with 8 L of seawater. The aquariums were put into a raceway system to maintain a temperature of 18 °C. All aquariums contained a pump to assure homogenization as well as re-suspension of algal cells. The 3 groups, *i.e.* unfed mussels, mussels fed *T. lutea* and mussels fed *P. tricornutum* were composed of 3 aquariums (4 aquariums for *P. tricornutum* diet) and the filter-feeding bivalves were subjected to the conditions presented in table 22. One mussel of treatment 2 (*i.e.* fed *T. lutea*) died at day 3 and was replaced by a marked mussel to maintain the conditions. However, this mussel was not used for the analysis.

Table 22: experimental conditions to which mussels were exposed.

Treatment	Algae		Days of feeding	Day of dissection
	Species	Cell.mL ⁻¹		
1 ^a	-	0	0	7
2 ^a	<i>Tisochrysis lutea</i>	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ *	5	7
3 ^b	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ *	5	5
4 ^b	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$1 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ *	5	7

^a treatment in triplicate; ^b treatment in duplicate; * mussels were fed daily with increasing concentrations of cells

The mollusks were fed once a day with increasing amounts of microalgal cells, at a final concentration ranging from 10 000 to 50 000 cells.mL⁻¹ per aquarium. To feed mussels, 1 L of seawater was removed and then replaced by 1 L of diluted microalgal culture (or 1 L of fresh seawater for treatment 1). At day 3 and at the end of the feeding experiment, seawater from all aquariums was totally renewed. One “control” aquarium without bivalves was used to assess the stability and homogenization of algal cells in the aquarium system. Thus, any decrease of cellular concentration could be attributed to the feeding process of mussels. Cellular concentrations in the aquariums were determined using a particle counter (Multisizer 3 Coulter counter, Beckman). After daily addition of algal cells and before any subsequent addition, 10 mL aliquots from each aquarium were quantified for total number of particles between 3.5 and 6 µm equivalent spherical diameter (spanning the size range of *P. tricornutum* and *T. lutea*), in replicate of 1 or 2 mL samples depending on the expected concentration.

Mussels fed *P. tricornutum* from two aquariums (n=10) were dissected at the end of the feeding period (*i.e.* after the 5 days of feeding), in case of possible fast depuration of BMAA. Mussels

in the other aquariums were maintained unfed during 2 extra days in renewed seawater, hence allowing for longer metabolism processes before dissection (*i.e.* 7 days after the beginning of the experiment). Mussel tissues were removed using a dissection scalpel and the digestive gland was separated from the remaining flesh. All tissues were placed into labeled 50 mL centrifuge tubes and stored in liquid nitrogen until lyophilization. Both digestive gland and remaining flesh tissues of mussels were analyzed in triplicate for BMAA, DAB and AEG.

3.4.6. Extraction procedures for total form of BMAA and DAB

All matrices were lyophilized before extraction. BMAA and DAB (total form) were extracted and analyzed as previously described (Réveillon et al., 2014) with both D₃BMAA and D₅DAB as internal standards. Briefly, freeze-dried material was grinded in TCA 0.1 M containing the internal standards. The supernatant was evaporated to dryness and hydrolyzed in HCl 6 M at 99 °C for 24 h before SPE clean-up on Bond Elut[®] Plexa PCX cartridges (Agilent Technologies, VWR, France) before injection.

3.4.7. Instrumentation and analytical method for BMAA and DAB

Liquid chromatography and tandem mass spectrometry were performed as in (Réveillon et al., 2014). BMAA, DAB and AEG were unambiguously distinguished thanks to chromatographic resolution, specific mass spectral transitions and qualitative to quantitative ion ratios. The common transition m/z 119 > 102 was used to quantify BMAA, DAB and AEG. To avoid overestimation of BMAA in mussel samples, the quantification was performed with the specific transition m/z 119 > 88 showing no interfering compound. The internal standards were quantified with the transitions m/z 122 > 105 and m/z 124 > 47 for D₃BMAA and D₅DAB, respectively.

Quantitation was performed relatively to pure standards of BMAA, DAB and AEG. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were the same as previously reported (Réveillon et al., 2014). For all isomers, LOQ was 0.23 µg g⁻¹ and 0.15 µg g⁻¹ dry weight (DW) for microalgae and mollusk matrices, respectively. Results were expressed as <LOQ when a peak was detected at a retention time corresponding to the internal standard but identity could not be verified by all criteria (*i.e.* specific mass spectral transitions and/or ion ratios could not be used). Corrective factors derived from both internal standards recoveries were applied to compensate for losses during samples preparation and matrix effects. The software Analyst 1.5.1 was used to analyze acquired raw data.

3.4.8. Statistical analysis

All data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyses consisted of one-way analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons versus unfed mussels as control group were performed (Holm-Sidak method). Before each ANOVA analysis, normality and equality of variance were tested. When equality test of variance failed, ANOVA on ranks was performed (Kruskal-Wallis method). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were carried out using SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

3.5. Results

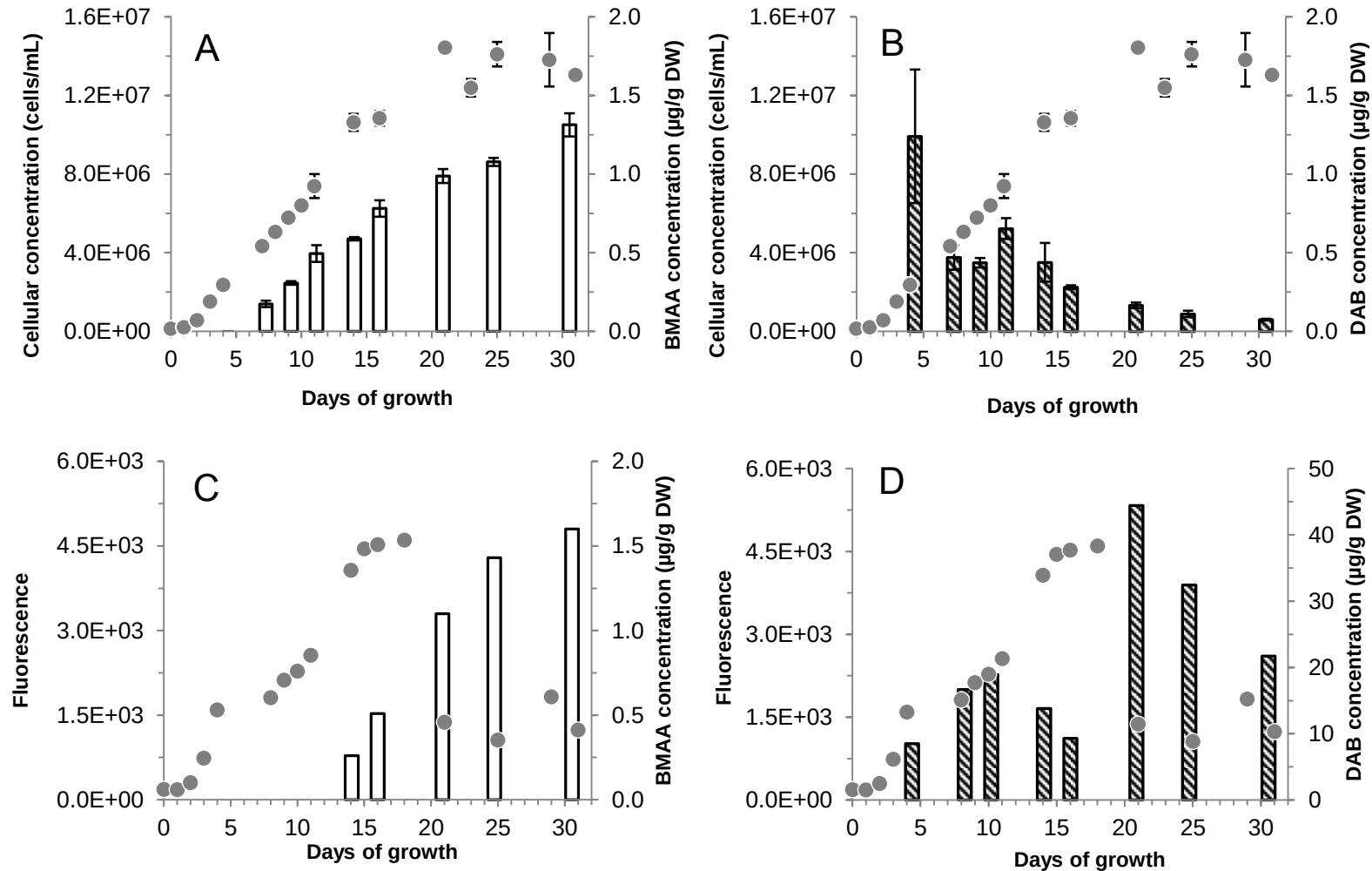
3.5.1. Kinetics of BMAA production by four diatoms species

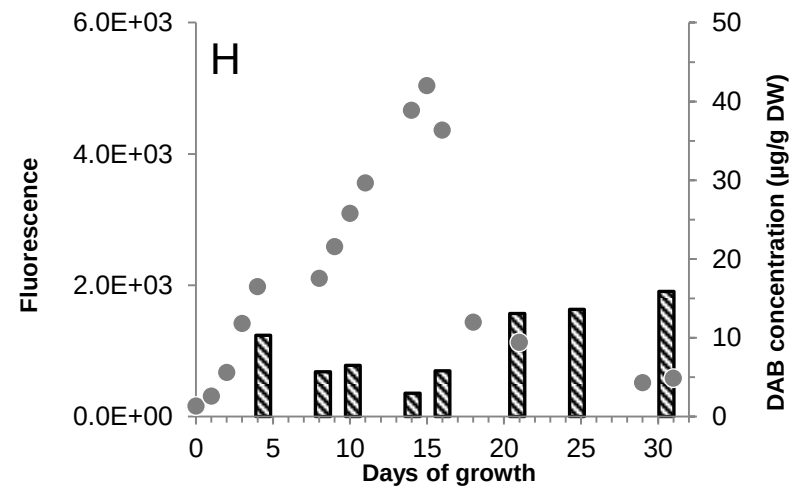
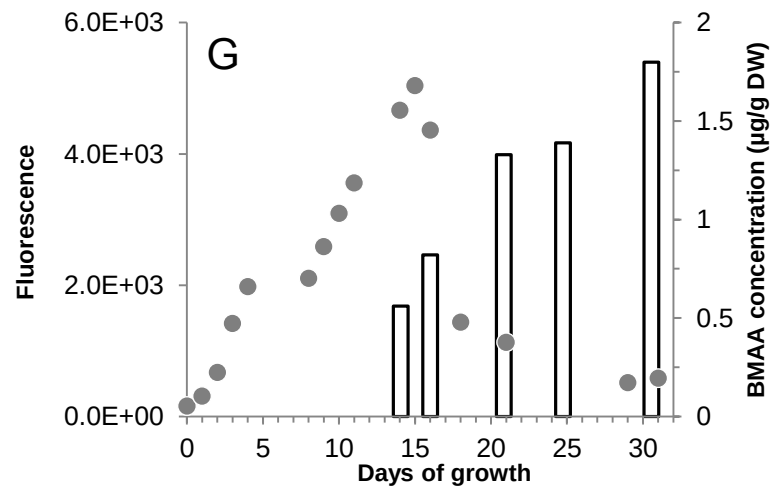
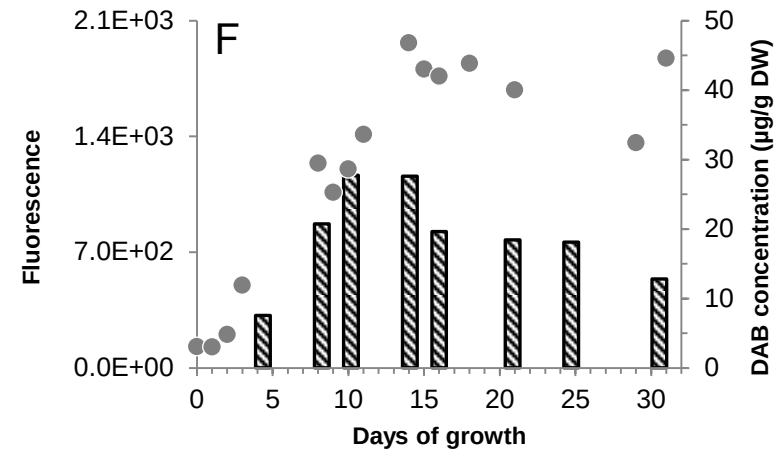
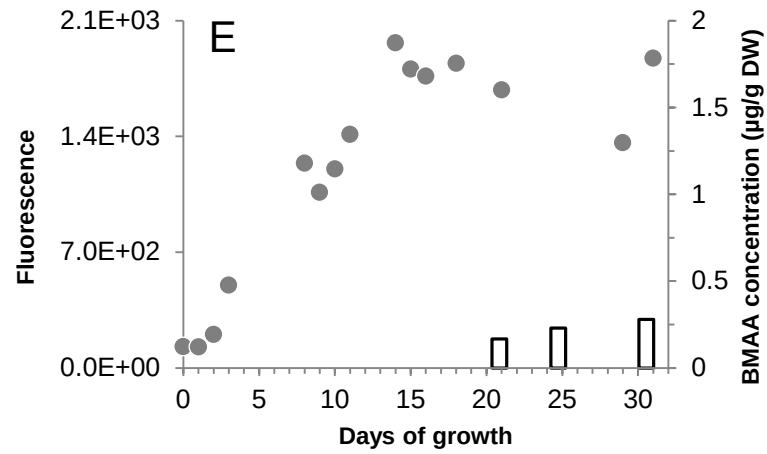
The results of growth and toxin production obtained for the four diatom species are shown in figure 39. The four species showed comparable growth curves with a short lag phase ($\leq$ two days), an exponential phase starting from day 2, up to day 21 for *P. tricornutum* and to day 14-15 for the three other species, then a stationary phase up to day 31 (*i.e.* the end of the experiment). The drop of fluorescence signal observed for *Chaetoceros* sp. and *T. pseudonana* coincided with the stationary phase and may be related to loss of chlorophyll, as a result of nutrient limitation (Ruivo et al., 2011).

BMAA in *P. tricornutum* was observed from day 7 until the end of the experiment, with increasing concentrations ranging from 0.20 to 1.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW. An inverse relationship was observed for DAB (from 1.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ to $< \text{LOQ}$). Chromatogram of *P. tricornutum* at day 25 can be seen in figure 41 supplementary material.

Similar pattern was observed for BMAA production in the three other diatom species. However, BMAA was first detected on day 14 for both *Chaetoceros* sp. and *T. pseudonana* and on day 21 for *C. calcitrans*. The BMAA concentrations were between 0.26 – 1.6, 0.17 – 0.28 and 0.56 – 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, respectively. DAB was always detected in these strains, at higher concentrations varying from 8.5 to 44 for *Chaetoceros* sp., 7.5 to 28 for *C. calcitrans* and 3.0 to 16 $\mu\text{g g}^{-1}$ for *T. pseudonana*.

Figure 39: growth (grey circle symbols) and production of BMAA (white bars) and DAB (black hatched bars), for respectively (A, B) *Phaeodactylum tricornutum* CCAP 1055/1, (C, D) *Chaetoceros* sp. (E, F) *Chaetoceros calcitrans* CCMP 1315 and (G, H) *Thalassiosira pseudonana* CCMP 1015. Error bars correspond to standard deviation. Cellular concentration was used as a proxy of growth only for *P. tricornutum* while fluorescence of chlorophyll was used as an alternative for the three other strains (*i.e.* formation of aggregates led to underestimated concentrations of cells).





3.5.2. BMAA in *P. tricornutum* treated with antibiotics

Bacterial population in *P. tricornutum* cultures was significantly reduced after the two cycles of antibiotic treatments (*i.e.* no growth observed on marine agar plates for the treated cultures, at both 15 and 30 mL.L⁻¹). Growth of treated and untreated cultures was very similar as were the BMAA and DAB concentrations after 16 days of growth. Indeed no significant difference was observed for BMAA and DAB concentrations as 0.62, 0.62 and 0.56 µg g⁻¹ of BMAA and 0.55, 0.53 and 0.59 µg g⁻¹ DW of DAB were quantified in the untreated culture, and the cultures treated with 15 and 30 mL.L⁻¹ of antibiotic solution, respectively (data not shown).

3.5.3. BMAA and isomers in bacteria isolated from *P. tricornutum* and mussels

One type of bacterial colony was obtained from *P. tricornutum* culture and another one from the seawater in the tank containing the mussels. The bacteria were screened for BMAA and isomers. While no BMAA was detected, DAB concentrations were 18.6 and 2.60 µg g⁻¹ DW in bacteria from *P. tricornutum* and from the seawater containing the mussels, respectively.

3.5.4. Contamination of mussels with *P. tricornutum*

Blue mussels were exposed to BMAA (*i.e.* *P. tricornutum* CCAP 1055/1) and non-BMAA (*i.e.* *T. lutea* CCAP 927/14) diets. The culture of *P. tricornutum* used to feed the bivalves contained between 0.82 and 1.3 µg g⁻¹ DW of BMAA (not detected in *T. lutea*). DAB was quantified in both microalgae, at ≤ 0.35 µg g⁻¹ in *P. tricornutum* and at ≤ 5.1 µg g⁻¹ DW in *T. lutea*, respectively. Mussels fed well on both diets as no remaining cells could be detected 24 h after the feeding, at any concentration. Microalgal cells concentration in the 'control' aquarium remained stable in the meantime (*i.e.* 108 and 100% for *P. tricornutum* and *T. lutea* after 24 h, respectively) thus the disappearance of cells was the result of mussels feeding on microalgae.

The concentrations of BMAA, DAB and AEG obtained in both digestive gland and remaining flesh tissues of mussels for all conditions are presented in figure 40.

BMAA and its two isomers were detected in all samples. Unfortunately, the three compounds were, as expected, already present in mussel tissues at the beginning of the contamination experiment (figure 42 supplementary material).

Contrasting results were observed for mussels that fed on BMAA-containing diet. Indeed, mussels from treatment four had significantly higher concentrations ($p < 0.05$) than the control group (*i.e.* unfed mussels) in both digestive glands (6.3 vs. 7.2 µg g⁻¹) and remaining flesh tissues (4.6 vs. 5.4 µg g⁻¹)

while mussels from treatment 3 had significantly lower BMAA amount in DG (6.3 vs. 5.3 $\mu\text{g g}^{-1}$). Mussels fed *T. lutea* had significantly higher BMAA level in RF than the control group, although no BMAA was detected in *T. lutea* culture.

Concerning DAB, no treatment was significantly different from the control group. For AEG, while no difference was observed among the five conditions for DG (vs. unfed mussels), the concentration in the RF tissue was significantly lower in all conditions, including at day 0.

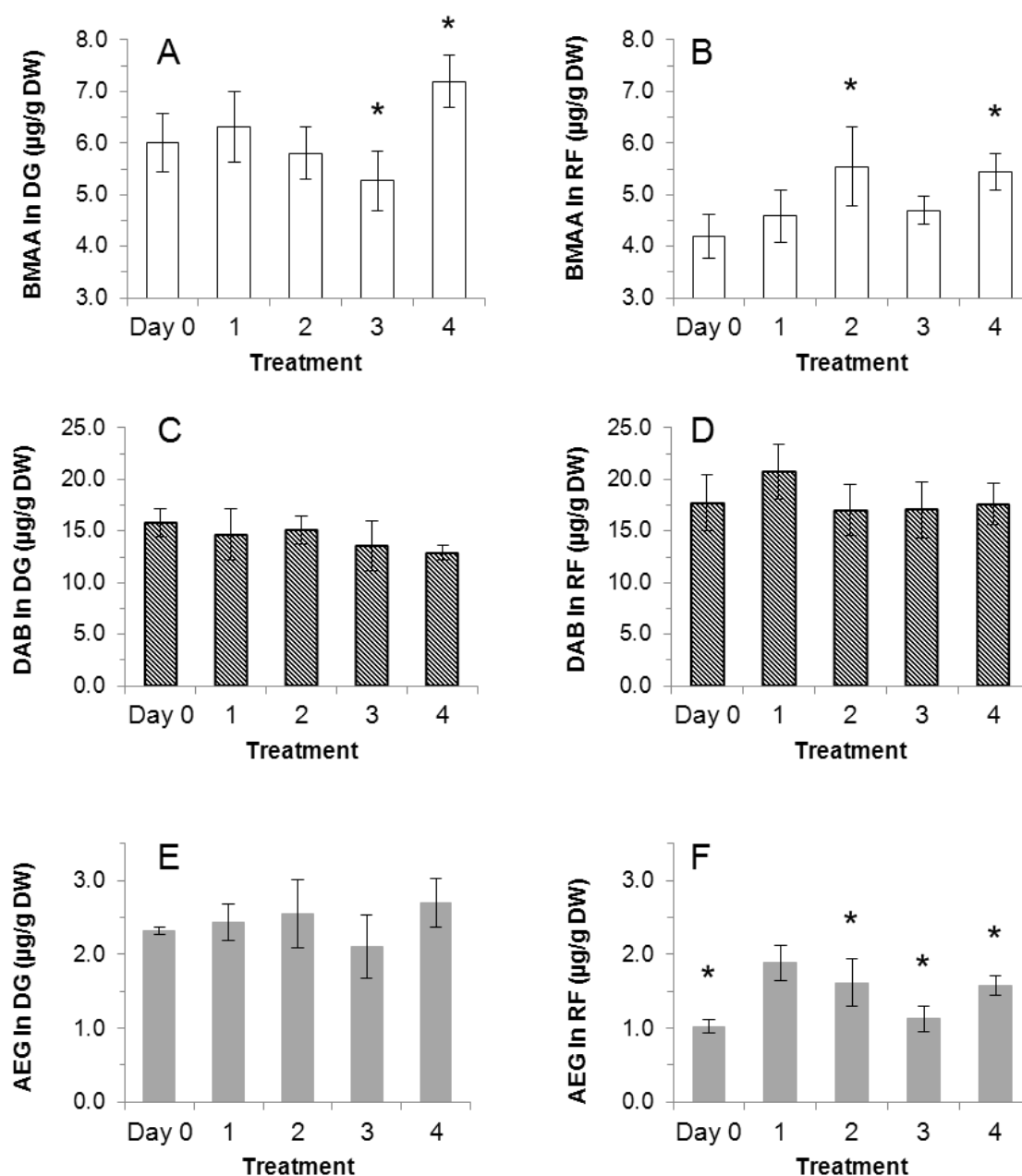


Figure 40 : mean concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) $\pm$ SD in digestive gland (DG) and remaining flesh tissues (RF) of (A, B) BMAA (white bars), (C, D) DAB (black hatched bars) and (E, F) AEG (grey bars). Treatment 1: unfed; 2: Fed *T. lutea*; 3: Fed *P. tricornutum* (5 days); 4: Fed *P. tricornutum* (5 days + 2 extra days); * significantly different from the control group ($p < 0.05$).

3.6. Discussion

The selective and sensitive HILIC-MS/MS method used in this study had previously been optimized (Réveillon et al., 2014). However, both reliability of BMAA identification and accuracy of quantification were further increased by the use of D₃BMAA as isotopically labeled internal standard. The mean total recoveries of both internal standards were in agreement with our previous studies (between 61 and 69%, ± 6 to 10%, depending on the matrix, for D₃BMAA and D₅DAB respectively) (Réveillon et al., 2014; Réveillon et al., 2015).

Even though cyanobacteria were the first organisms suspected to produce BMAA (Cox et al., 2005), only few species were confirmed to contain BMAA using highly selective methods (Jiang et al., 2013). On the opposite, some marine phytoplanktonic species belonging to diatom and dinoflagellate groups were recently reported to contain BMAA (Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014; Lage et al., 2015b; Réveillon et al., 2015). Nevertheless, kinetics of BMAA and isomers production by marine microalgae has not been studied so far. For this purpose, four diatom strains that had previously been reported to contain BMAA were used in this study (Réveillon et al., 2015). Two *Chaetoceros* species (CCMP 1315 and isolated from Argenton, France), one *Phaeodactylum tricornutum* (CCAP 1055/1) and one *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1015) strains were cultivated under classic and identical conditions. As for other toxins produced by microalgae (e.g. (Hwang and Lu, 2000; Jauffrais et al., 2013; Thorel et al., 2014)), BMAA was not only detected in nutrient-stressed cells and production increased with the growth (*i.e.* from mid or late exponential phase), while maximum BMAA concentrations were observed at the end of the stationary phase. Both appearance and concentration of BMAA varied between strains. *P. tricornutum* showed a wider BMAA production than the three other species, with BMAA detected from day 7 (*i.e.* mid exponential phase). The concentrations at the end of the kinetic experiments were similar for three out of the four strains (*i.e.* from 1.3 to 1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW), except in *C. calcitrans* in which BMAA concentration was about 5 times lower. Therefore, BMAA production by diatoms may be species-specific as for other toxin-microalgae combination (Thessen et al., 2009; Anderson et al., 2012; Reguera et al., 2012).

Data about BMAA production by primary producers are scarce in the bibliography. However, it has been suggested that cyanobacteria in culture displayed fluctuating production (Jiang et al., 2014a) that may be linked to nitrogen availability (Downing et al., 2011; Scott et al., 2014). Here, it is unlikely that BMAA appearance was the result of a nitrogen starvation as BMAA was detected during exponential growth phase (except for *C. calcitrans*) but the impact of nitrogen availability should be further studied.

BMAA was not detected in early exponential growth phase, which might suggest that some factors trigger or enhance its production.

DAB, an isomer of BMAA largely reported in microalgal species (Krüger et al., 2010; Jiang et al., 2014a; Lage et al., 2014; Réveillon et al., 2014) was also detected in the four diatom strains. In *P. tricornutum*, the two isomers were present in similar concentrations (*i.e.* $< 1.4 \mu\text{g g}^{-1}$ DW). However, much higher concentrations were found in the other species but no particular patterns could be defined. The concentrations, from 7.5 to 44 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, are in agreement with those reported by other groups, but relatively high in comparison to the concentrations that our group has previously observed (Rosen and Hellenas, 2008; McCarron et al., 2014; Réveillon et al., 2014).

Biosynthetic pathways of the two non proteinogenic amino acids are still lacking and as far as we know, neither a common precursor nor BMAA-DAB or DAB-BMAA conversions have been reported to explain the relative variation of concentrations in the different diatom species.

As xenic cultures of diatoms were used, the hypothesis that BMAA and DAB production by diatoms may be directly or indirectly influenced by bacteria cannot be excluded. Bacteria-diatoms interactions are common (Doucette, 1995; Amin et al., 2012; Paul et al., 2013). They are recognized as an important factor in the physiology of diatoms (Grossart et al., 2005; Rooney-Varga et al., 2005) and might be involved in the production of the neurotoxin domoic acid by *Pseudo-nitzschia* (Bates et al., 1995; Sison-Mangus et al., 2014). A potential bacterial BMAA production has not been reported yet. However, DAB is present in bacteria. Indeed, it has been detected in the peptidoglycan cell wall of actinomycetes and had been used as a diagnostic diamino acid for identifying new strains (Groth et al., 1996). Moreover, a gene encoding DAB has been identified in *Acinetobacter baumannii* (Ikai and Yamamoto, 1997). To assess the impact of bacteria on BMAA and DAB production by *P. tricornutum*, antibiotic treatments and bacteria isolation were concurrently performed on the same culture. Analysis revealed that both growth and BMAA and DAB contents in *P. tricornutum* cells were not influenced by bacteria as no significant difference was observed between treated and untreated cultures. However, while BMAA was not directly detected in bacteria isolated from *P. tricornutum* culture, high concentration of DAB was found. This observation may be relevant for DAB production by diatoms, especially for *Chaetoceros* sp. and *Thalassiosira pseudonana* strains on which no antibiotic treatment was performed. Moreover, these three diatom strains displayed high concentrations of DAB (*i.e.* in comparison to *P. tricornutum*) that was not correlated to the growth. Bacterial community may explain the high concentration of DAB as well as its dynamic in *Chaetoceros* sp. and *Thalassiosira pseudonana*

cultures. Thus further work is required to disentangle in which proportion bacteria (including symbiotic bacteria) are involved in DAB production by diatoms and more broadly by microalgae.

The control of toxin production by microalgae is thought to be complex and triggered by many environmental factors, as for azaspiracids or domoic acid, two phycotoxins produced by the dinoflagellate *Azadinium spinosum* and the diatom *Pseudo-nitzschia* (Trainer et al., 2012; Jauffrais et al., 2013). Here, the concentration of BMAA and DAB were assessed over time but in only one and non-limiting condition (*i.e.* conditions for routine maintenance). Therefore, the factors controlling BMAA production by diatoms should be further investigated (e.g. salinity, temperature, irradiance, culture media, nutrient sources and bacteria-diatom interactions) as stressed cells are assumed to produce more toxins (Bates and Trainer, 2006).

Bioaccumulation and depuration of microalgal toxins in mollusks have been well studied (Bricelj and Shumway, 1998; Ibelings and Chorus, 2007; Ferrao and Kozlowsky-Suzuki, 2011) except for BMAA. The fact that BMAA producers are not well identified and its production not elucidated yet may have hampered the study of BMAA bioaccumulation by filter-feeding organisms. After the observation of BMAA production by diatoms, a contamination experiment of blue mussels was performed in controlled conditions. *Phaeodactylum tricornutum* (CCAP 1055/1) was selected as a BMAA-containing diet while *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) was chosen as a non-BMAA diet.

BMAA and isomers were already present in mussel tissues before the beginning of the experiment, in both digestive gland and remaining flesh tissues. This observation is not surprising as the three compounds have been detected in all French mollusk samples screened so far (Réveillon et al., 2015). Therefore, accumulation was compared relatively to unfed mussels.

Only mussels of treatment four (*i.e.* fed *P. tricornutum* for five days that stayed two extra days in clean seawater) had significantly ($p < 0.05$) higher BMAA concentration in both DGs and RFs, in comparison to the control group, unfed mussels. This observation may suggest that *P. tricornutum* diet led to the accumulation of BMAA in blue mussels but this accumulation showed some delay. Indeed, accumulation of other microalgal toxins in mussels was generally faster (e.g. from only six hours to two days after the beginning of the feeding experiment for azaspiracids, cylindrospermopsin and microcystin-LR (Vasconcelos, 1995; Saker et al., 2004; Jauffrais et al., 2012)).

The significantly lower BMAA concentration in DG of mussels of treatment three and higher concentration in RF of mussels fed *T. lutea* were surprising. This might arise from individual variability or different metabolic processes e.g. transfer of BMAA between DG and RF, as hypothesized for domoic acid in oyster and mussel tissues (Mafra et al., 2010). Indeed, if the mean BMAA concentration between

DG and RF tissues is considered, only mussels of treatment 4 had significantly higher concentration than the control group. Concerning DAB, no significant difference was observed. DAB levels in mussels were not influenced by starvation or feeding while DAB was detected in both *P. tricornutum* and *T. lutea* cells. DAB concentrations found in this study are in the higher range of concentrations that have been observed in mollusk or crustacean tissues so far (Masseret et al., 2013; Banack et al., 2014; Réveillon et al., 2014). This compound was detected in the bacterial colony isolated from the seawater in which mussels were maintained. The bivalves are known to contain bacteria and are able to accumulate and assimilate them from the surrounding environment (Cavallo et al., 2009). The origin of the isolated bacteria (*i.e.* from the mussels or the seawater used for the experiment) is unknown but as mussels can concentrate bacteria in high abundances, their implication on the DAB concentrations found in mussels cannot be inferred. For AEG, while no difference was observed for DGs, significantly lower concentrations were observed in RF tissues, for all conditions in comparison to unfed mussels. These differences cannot be explained, especially between mussels at day 0 and unfed mussels that were maintained in similar conditions (*i.e.* starved and kept in clean aerated and recirculating seawater).

BMAA has been suggested to be incorporated into proteins during protein synthesis and bioaccumulated by this mechanism (Murch et al., 2004a). However, (Glover et al., 2014) have reported that BMAA may also be non-covalently bound to proteins. While free BMAA can be taken up by freshwater and marine mussels, incorporation into proteins was either not observed or not studied (Downing et al., 2014; Baptista et al., 2015). Therefore, the exact nature of BMAA-protein interactions has not been unequivocally explained and the mechanism of bioaccumulation remains to be elucidated, including in mollusks.

(Baptista et al., 2015) also reported an accumulation of BMAA in mussels exposed to BMAA-producing cyanobacteria. While this valuable study is the first one reporting accumulation of BMAA in aquatic organisms as a result of feeding, the results are difficult to interpret despite the use of a selective HILIC-MS/MS method. Indeed, only trace amounts of BMAA were detected in the *Synechocystis salina* strain while mussels accumulated relatively high BMAA content in their tissues, right from day 4 (ca. 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

In this study, an accumulation of BMAA was observed in mussels that were exposed to *P. tricornutum*, but unlike (Baptista et al., 2015) it was weak and only in mussels that were kept two more days in clean seawater after exposure to the BMAA containing diet. This extra-time might have allowed for metabolic processes leading to accumulation from protein-associated BMAA in *P. tricornutum* to protein-associated BMAA in mussel tissues. Unfortunately, individual dry weight of mussels was not measured therefore no precise mass balance could be determined. In another study, *M. edulis* of similar

size (*i.e.* 50 vs. 49 mm mean shell-length) had a total dry weight of ca. 300 mg after spawning and the digestive gland represented approximately 60 mg (Hawkins et al., 1985a). It was estimated that 1 mg DW of *P. tricornutum* corresponded to 2.4×10^7 cells. The culture used to feed mussels contained a mean BMAA concentration of $1.1 \mu\text{g g}^{-1}$ DW. Finally, each mussel consumed approximately 2.4×10^8 *P. tricornutum* cells (*i.e.* 10 mg DW) over the five days exposure, corresponding to ca. 183 ng.g^{-1} of BMAA in digestive gland (assuming 100 % assimilation from microalgal cells). These estimations may be incorrect but are lower than the accumulation of BMAA observed here (increase of ca. 800 ng.g^{-1} in DG). Hence, the increase of BMAA in mussels fed *P. tricornutum* cannot be fully explained and further work is required. It is unfortunate that (Baptista et al., 2015) did not perform a mass balance analysis to evaluate the plausibility of their results, as it was done here and that they did not use an internal standard to ensure for both correct BMAA identification and accurate quantification.

Both exposure duration and amount of ingested cells may have not been sufficient to unequivocally show an accumulation of BMAA in blue mussels in the present study. Therefore, prolonged exposure with continuous feeding should be conducted to confirm that mussels are able to accumulate BMAA as a result of feeding, thus corroborating the work of (Baptista et al., 2015).

The study of BMAA depuration was not included here. Nevertheless, mussels that were maintained for two months in clean seawater after the end of the contamination experiment were analyzed. BMAA, DAB and AEG were still present in both digestive gland and remaining flesh tissues. The concentrations were similar to those obtained at day 0 of the contamination experiment (*i.e.* $\leq 20\%$ difference) suggesting that depuration of the three non-proteinogenic amino acids could require long time. In a previous study, BMAA isomers were always detected in mussel samples collected over a year (Réveillon et al., 2015) suggesting again a long depuration process. However, depuration as well as metabolism processes should be specifically studied.

As polar molecules, bioaccumulation of BMAA and isomers is uncommon and unlike most toxins produced by microalgae, significant proportion of BMAA in its bound form (*i.e.* 59%) were found in the non-visceral tissues of mussels *M. galloprovincialis* from Thau lagoon, France (Réveillon et al., 2015). In the present study, the relative abundance of BMAA in DGs of *M. edulis* was higher than in RF tissues (mean of 56%). The difference could arise from biological variability (*i.e.* difference of species and location) or be the result of the spawning of mussels during the acclimatization period. Indeed, spawning represents a high energy cost process for mussels that may lose a large proportion of their body weight, especially for the mantle which contains glycogen and protein reserves (Bayne and Worrall, 1980; Hawkins et al., 1985a). Therefore, the impact of reproductive cycle, which is a key event in mussel

physiology (Lubet, 1959; Lemaire et al., 2006), should be investigated on the BMAA content of mussels, especially on its distribution among mussel tissues.

3.7. Conclusion

The prevalent presence of BMAA in aquatic organisms of higher trophic levels in freshwater ecosystems has predominantly been associated with the occurrence of cyanobacteria. In the marine environment, diatoms may represent a more likely primary source of BMAA. It is therefore necessary to study BMAA production by diatoms as well as BMAA accumulation in organisms, as a result of feeding on BMAA-producing microalgae.

The four diatom strains that were used in this study did produce BMAA. Kinetics of production were species-specific. Maximum BMAA concentrations were observed at the end of the experiment (*i.e.* late exponential phase) as for many toxin-microalgae combination. However, the factors that trigger BMAA production should be further investigated. As mussels can feed on diatoms, a contamination experiment of blue mussels was attempted with *P. tricornutum* containing BMAA (concentration of $1.1 \mu\text{g g}^{-1}$ DW). After five days of exposure, higher BMAA concentrations in both digestive gland and remaining flesh tissue were detected in mussels fed *P. tricornutum* that stayed two extra days in clean seawater at the end of the contamination. This extra-time may have allowed for longer metabolic processes leading to a BMAA accumulation. However, estimated mass balance could not fully explain the observed increase of BMAA concentration in mussels. This first trial using a BMAA containing diatom should be improved by using prolonged exposure duration and higher amounts of ingested cells. The accumulation of BMAA by mussels and other aquatic organisms as a result of feeding has to be unambiguously confirmed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out under the RISALTOX project (Ifremer) and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. The authors would like to thank all of the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study.

3.8. Supplementary material

Figure 41: Extracted ion chromatogram of *P. tricornutum* culture at day 25 of the kinetic experiment. Black dotted line represent transition m/z 122 > 105 used to quantify D₃BMAA. It can be seen that retention time of the internal standard matched the one of BMAA naturally occurring in the culture of *P. tricornutum*. Moreover, no compound interfered with the transition m/z 119 > 102.

Figure 42: Extracted ion chromatograms of (A) digestive gland of mussel at J0 and (B) digestive gland of mussels fed *P. tricornutum* for 5 days that stayed two more days in clear water. Black dotted line represent transition m/z 122 > 105 used to quantify D₃BMAA while dark grey and light grey lines represent specific mass spectral transition m/z 119 > 88 and 119 > 76, respectively. It can be seen that retention time of the internal standard matched the one of BMAA naturally occurring in mussel digestive glands and in mussel fed a diatom containing BMAA.

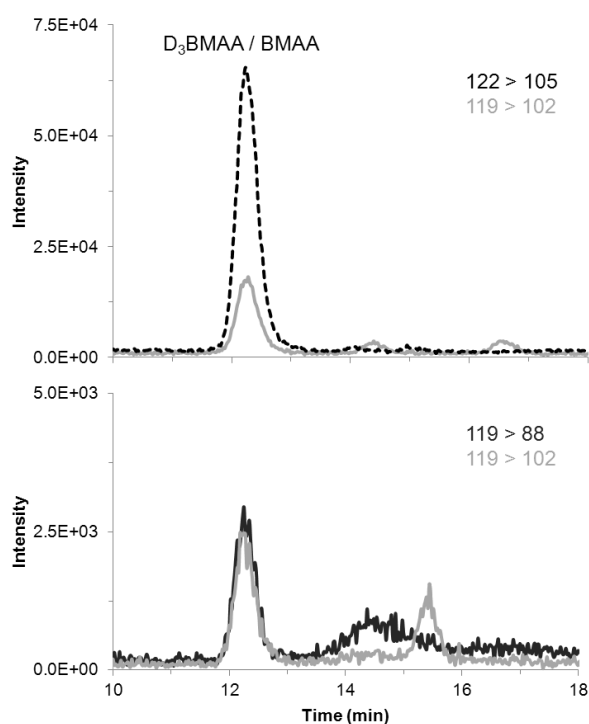


Figure 41 : extracted ion chromatograms of *P. tricornutum* culture at day 25 of the kinetic experiment. Black dotted line represent transition m/z 122 > 105 used to quantify D₃BMAA. It can be seen that retention time of the internal standard matched the one of BMAA naturally occurring in the culture of *P. tricornutum*. Moreover, no compound interfered with the transition m/z 119 > 102.

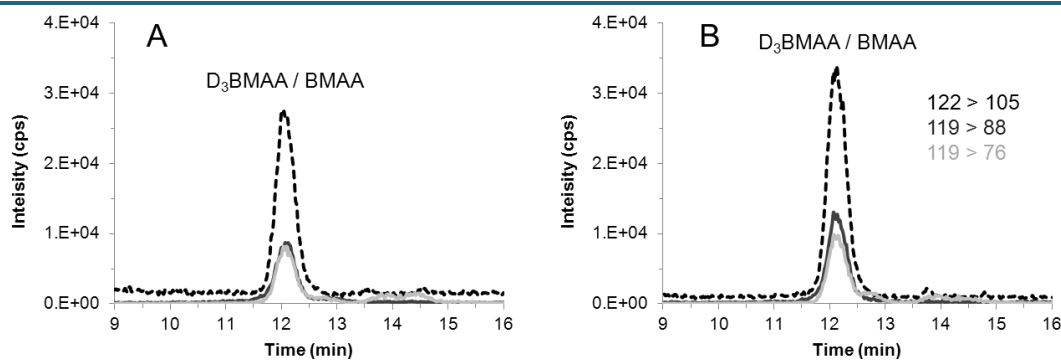


Figure 42 : extracted ion chromatograms of (A) digestive gland of mussel at J0 and (B) digestive gland of mussels fed *P. tricornutum* for 5 days that stayed two more days in clear water. Black dotted line represent transition m/z 122 > 105 used to quantify D_3 BMAA while dark grey and light grey lines represent transition m/z 119 > 88 and 119 > 76, respectively. As a compound interfered with the transition m/z 119 > 102, only specific mass spectral transitions showing no interference were represented. It can be seen that retention time of the internal standard matched the one of BMAA naturally occurring in mussel digestive gland and in mussel fed a diatom containing BMAA.

Conclusions et perspectives

La β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) est un acide aminé non protéique neurotoxique qui serait associé aux maladies neurodégénératives et notamment la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Sa production par l'ensemble des cyanobactéries, qui était communément admise, a été remise en question avec l'évolution des méthodes analytiques. En France, le « réseau de méthodologie coordonnée d'investigation des agrégats spatio-temporels de SLA » avait mis en évidence un cluster significatif autour de la lagune de Thau et rapporté des traces de BMAA dans des mollusques de cette zone conchylicole (Masseret et al., 2013).

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été de (i) développer et caractériser une procédure analytique utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) pour l'analyse de la BMAA et ses isomères (DAB et AEG) (ii) mettre en culture des souches de microalgues (e.g. cyanobactéries, dinoflagellés, diatomées), les cribler et étudier leur production de BMAA et isomères, (iii) étudier la présence de ces composés dans différents compartiments de la lagune de Thau et plus généralement, dans les mollusques bivalves en provenance de différentes zones de production sur les côtes françaises métropolitaines (iv) étudier la contamination en conditions contrôlées des moules par une culture de diatomée productrice de BMAA et ses isomères et (v) enfin, après avoir mis en place une procédure d'analyse par CL-SM/SM des cyanotoxines lipophiles et hydrophiles principales, réaliser un état des lieux de leur présence dans l'environnement marin français via le criblage de mollusques bivalves et de périphytons (biofilms). Ainsi, les conclusions et les perspectives sont présentées ci-après pour chacun des objectifs des travaux de thèse.

Développement de la méthode : de l'extraction à l'analyse de la BMAA et ses isomères

Lors de l'étude de la littérature réalisée en début de thèse, nous avons constaté que l'analyse de la BMAA était remise en question. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons optimisé une méthode très sélective en prenant en compte les contraintes de l'analyse de cette petite molécule polaire (*i.e.* 118 Da) (Réveillon et al., 2014). A défaut d'un consensus sur la « meilleure » méthode, nous avons choisi une analyse sans dérivation des analytes impliquant l'emploi d'une chromatographie HILIC associée à la spectrométrie de masse en tandem. Cette méthode HILIC-SM/SM permet de quantifier la BMAA et ses isomères dans des échantillons biologiques (e.g. microalgues, bivalves marins) à la fois sous la forme libre et la forme associée aux protéines. La procédure implique une étape d'extraction avec l'acide trichloroacétique (0,1 M) pour solubiliser la BMAA libre et les protéines auxquelles elle est associée. Une hydrolyse acide classique (*i.e.* HCl 6 M chauffé pendant 24h) permet ensuite de libérer la BMAA associée aux protéines et de la quantifier. Au lieu de précipiter sélectivement les protéines

(processus long dont les rendements peuvent fluctuer en fonction de la nature des matrices), l'hydrolyse acide sur l'ensemble de l'échantillon permet d'estimer la concentration de BMAA totale et indirectement la proportion associée aux protéines par différence entre la concentration de BMAA totale et celle de BMAA libre. Les échantillons sont ensuite purifiés par SPE (*i.e.* cartouche Plexa PCX d'Agilent permettant les échanges cationiques) afin de réduire les effets matrices. Malgré les pertes de rendements associées, l'effet matrice résiduel après notre procédure SPE est inférieur à 15 % (pour les matrices de cyanobactéries et mollusques) alors que d'autres équipes obtiennent des suppressions de signal plus importantes (e.g. ≥ 40 % de suppression de signal pour Combes et al. (2013) dans les cyanobactéries avec une méthode HILIC-SM/SM également).

L'importance de la sélectivité dans l'analyse de la BMAA est essentielle puisque ses isomères (e.g. DAB et AEG), mais également d'autres composés des matrices, peuvent interférer avec une identification formelle de la BMAA et donc générer des faux-positifs ou des surestimations. Par conséquent, ce critère de sélectivité doit être privilégié à celui de la sensibilité. Aussi, nous avons optimisé (i) la résolution chromatographique en utilisant la colonne Zic-HILIC® qui a montré d'excellentes performances dans cette étude (ii) les critères de de détection grâce à l'API-5500 QTRAP dédié pour l'analyse des petites molécules :

- utilisation de transitions sélectives pour l'identification formelle (m/z 119 > 88, 76 ou 459 > 258 pour la BMAA sans et après dérivation avec AQC) et pas seulement de transitions communes aux isomères connus (e.g. m/z 119 > 102 ou 459 > 289).
- utilisation des ratios d'ions (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 (*i.e.* traits de filet de plancton, périphytons et mollusques) hydrolysés pour la détection de la BMAA totale, nous avons observé une interférence. Comme ce composé répond seulement à la transition utilisée pour la quantification de la BMAA (m/z 119 > 102), nous recommandons, 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 BMAA dans ces matrices. Cependant, la nature de cette interférence devrait être déterminée à l'avenir. Il faut notamment s'assurer qu'il ne s'agit pas de la BAMA, un isomère de la BMAA rapporté seulement dans les moules de mer Baltique à ce jour (Jiang et al., 2013).

Malgré le fait que les effets matrices et les rendements d'extraction peuvent impacter les résultats, la plupart des équipes ne rapportent pas ces informations fondamentales. Ils doivent

néanmoins être déterminés et rapportés pour chaque type de matrice analysée, ainsi que les limites de quantification, nous permettant de comparer les concentrations obtenues entre différentes études. La méthode développée ici a été caractérisée pour l'analyse des microalgues (e.g. cyanobactérie) et des mollusques marins (*i.e.* huîtres et moules). Les limites de quantification sont de $0,23 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW pour les cyanobactéries [*versus* $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW rapporté par Jiang et al. (2013)] et $0,15 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW pour les mollusques. Notons que la limite de quantification est environ trois fois plus haute si on utilise la transition m/z 119 > 88 pour quantifier la BMAA dans les mollusques.

L'emploi d'étalons internes est fortement recommandé pour s'assurer de l'identification et de la quantification de la BMAA. Aussi, dans un premier temps, nous avons intégré dans la méthode du DAB deutéré (*i.e.* D₅DAB) comme étalon interne. Depuis 2015, la BMAA deutérée (*i.e.* D₃BMAA) est commercialisée par Novakits (Nantes), nous l'avons donc également incluse dans notre procédure. Ces étalons internes nous permettent de corriger les pertes liées à la préparation d'échantillon et aux effets matrices.

La méthode HILIC-SM/SM que nous avons développée et optimisée au cours de ces travaux de thèse est l'une des plus sélectives rapportées à ce jour, tout en ayant une bonne sensibilité. A notre connaissance, aucune autre méthode n'emploie à la fois de la D₃BMAA et du D₅DAB comme étalons internes. A l'avenir, il faudrait améliorer les rendements d'extraction (e.g. utiliser un autre adsorbant SPE), la sensibilité (e.g. extraire davantage de lyophilisat si l'effet matrice n'est pas plus fort), ainsi que la rapidité d'analyse (e.g. colonne UPLC).

Malgré les inquiétudes de certains envers la chromatographie HILIC (e.g. Banack et al., 2010), il ne nous apparaît pas nécessaire d'utiliser une dérivation pré-analyse pour obtenir une méthode fiable d'analyse de la BMAA. La méthode utilisée dans cette étude ne devrait pas être remise en question par la communauté scientifique, ni alimenter la controverse analytique entourant la BMAA (*cf.* chapitre 1 paragraphe 2.8.2). Grâce à cette méthode HILIC-SM/SM, nous avons pu détecter et quantifier de la BMAA dans diverses matrices (e.g. cultures de microalgues d'eau douce et marines, plancton, périphyton, huîtres et moules collectées dans l'environnement).

Cependant, la production d'un matériel de référence semble nécessaire pour que l'ensemble de la communauté scientifique puisse caractériser leurs méthodes et comparer leurs résultats, sans a priori sur les méthodes (*i.e.* dérivation vs. sans dérivation).

Production de BMAA par les cyanobactéries

La production généralisée de BMAA par les cyanobactéries a été remise en question par le rapport de Faassen et al. (2012) qui montrait pour la première fois le manque de sélectivité de la méthode d'analyse utilisant la détection par fluorescence après dérivation.

Au début de ces travaux de thèse, nous avons tout d'abord mis en culture certaines souches de cyanobactéries ayant été rapportées productrices dans la bibliographie (*i.e.* souches référencées provenant de collections comme celle de l'institut Pasteur). Par la suite, nous avons eu l'opportunité d'obtenir des picocyanobactéries isolées dans l'étang de Thau où de la BMAA a été détectée dans les huîtres et les moules (Masseret et al., 2013). La caractérisation de la production de BMAA par les cyanobactéries est méconnue. Nous avons malgré tout testé les hypothèses avancées dans la bibliographie (*i.e.* la production serait dépendante de la phase de croissance et/ou d'un stress azoté).

L'ensemble des résultats, obtenu sur plus de 200 échantillons correspondant à une quinzaine de souches de cyanobactéries, a montré (i) l'absence de BMAA dans les souches de cyanobactéries analysées, alors que les concentrations rapportées dans la bibliographie sont généralement détectables par notre méthode HILIC-SM/SM (e.g. $0,73 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW pour *Leptolyngbya* sp. PCC 73110) ; (ii) le suivi des cinétiques de production potentielle de la BMAA et l'effet d'un stress azoté (*i.e.* culture dans un milieu sans source d'azote assimilable) réalisés sur deux souches rapportées productrices de BMAA n'ont rien révélé de probant.

Au-delà d'une éventuelle variabilité biologique (mais restreinte sur les souches référencées surtout que nous avons utilisé des conditions de culture similaires), nos résultats confirment la tendance de travaux récents (e.g. Faassen et al., 2012), à savoir que la BMAA n'est pas largement produite par ces procaryotes et/ou en concentrations beaucoup plus faibles que celles obtenues avec des méthodes non sélectives. A l'inverse, du DAB (dans pratiquement tous les échantillons, sous forme libre et associée aux protéines) et parfois de l'AEG (associé aux protéines) ont été retrouvés. Il est donc urgent de clarifier la production de BMAA par les cyanobactéries (quelles souches en produisent, de façon constitutive ou induite, à quelles concentrations). Pour cela, l'élucidation des voies de biosynthèse semble primordiale.

Production de BMAA par les autres microalgues

Suite aux résultats obtenus dans notre étude terrain sur la lagune de Thau (*i.e.* présence de BMAA dans le seston) et aux rapports de deux groupes suédois (Jiang et al., 2014a ; Lage et al., 2014), nous avons mis en culture et criblé de nombreuses espèces de microalgues marines. Nous avons ainsi confirmé la production de BMAA par certaines espèces de diatomées : *Phaeodactylum tricornutum*

(CCAP 1055/1), *Chaetoceros* sp. (Argenton, Manche, France), *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315), *Thalassiosira pseudonana* (CCMP 1015) et *Halamphora coffeaeformis* (CCAP 1001/2). Parmi les 12 souches de diatomées criblées, cinq produisent donc de la BMAA avec des concentrations allant de l'état de trace pour *H. coffeaeformis* à $1,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ DW pour *T. pseudonana*. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que (Lage et al., 2015b) mais nettement supérieures à celles de Jiang et al. (2014a) qui ont utilisé des souches axéniques. Le traitement de notre souche *P. tricornutum* avec des antibiotiques ne s'est pas traduit par une différence significative des concentrations de BMAA et DAB entre les cultures traitées et non traitées. Les bactéries ne semblent donc pas avoir d'impact sur la production de ces acides aminés non protéiques chez *P. tricornutum*. Cependant ce constat ne pas être extrapolé aux autres souches productrices et doit être vérifié.

Les cinétiques que nous avons réalisées révèlent que les niveaux de production sont fonction des souches de diatomées et que les concentrations augmentent dès la phase exponentielle et sont maximales en phase stationnaire. La non-détection de BMAA au début de la croissance signifie soit qu'elle était présente à une concentration inférieure à la limite de détection, soit que la production est induite mais l'origine reste à déterminer. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'influence des facteurs environnementaux et nutritionnels sur la production de BMAA par les diatomées (e.g. types et concentrations de nutriments, salinité, lumière).

Contrairement aux diatomées analysées ici, aucune autre espèce de microalgue analysée ne contenait de BMAA suite au criblage de huit souches de dinoflagellés, six de cryptophycées et huit autres (e.g. chlorophycées, prymnesiophycées, prasinophycées).

Comme pour les cyanobactéries, le DAB a largement été retrouvé dans les cultures de microalgues marines. Nous avons découvert qu'il pouvait être produit en concentration élevée par une bactérie marine isolée à partir d'une culture de *P. tricornutum*. Jusqu'à présent, peu de souches de microalgues (procaryotes et eucaryotes) axéniques ont été utilisées pour rechercher la BMAA et ses isomères. Il reste donc à évaluer dans quelle proportion les bactéries présentes dans les cultures ont contribué aux concentrations de DAB rapportées.

L'annexe 13 résume toutes les microalgues que nous avons criblées pour la recherche de BMAA et ses isomères. Celles-ci sont à la base des réseaux trophiques, elles représentent donc des potentielles sources d'alimentation pour les bivalves filtreurs. La non-détection de BMAA dans les cyanobactéries en culture à l'inverse des diatomées suggèrent que les voies de bioaccumulation doivent être réévaluées, surtout dans le milieu marin.

Présence de BMAA et isomères sur le littoral français métropolitain

En se basant sur le contexte des travaux de thèse rappelé au début de ce paragraphe, nous nous sommes d'abord intéressés à la lagune de Thau. Après avoir confirmé la présence de BMAA et ses isomères dans les huîtres et moules de Thau prélevées pendant l'été 2009 (*cf.* chapitre 2), nous avons étudié pendant plus d'une année (juillet 2013 – octobre 2014) sa présence dans différents compartiments de la chaîne alimentaire de la lagune (plancton, moules et leur périphyton « biofilms recouvrant les moules »). La BMAA et le DAB ont été retrouvés dans pratiquement tous les échantillons (*i.e.* sous forme associée aux protéines) et les concentrations croissantes observées nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'une bioaccumulation dans les bivalves. Cependant, afin de disposer d'éléments pouvant cerner l'origine de cette bioaccumulation, le protocole de prélèvement du plancton devrait être optimisé pour mieux discriminer le phytoplancton du zooplancton et pourrait être également adapté à l'analyse du picoplancton.

L'analyse du seston prélevé à Thau, riche en diatomées (données REPHY), a montré la présence de la BMAA et du DAB. Comme les diatomées soutiennent la croissance des mollusques de la lagune (Pernet et al., 2012), et que certaines peuvent produire de la BMAA (montré plus haut) leurs proliférations pourraient être liées aux concentrations de BMAA trouvées dans le tissu des mollusques de la lagune.

Après les observations faites à Thau, nous avons évalué la présence potentielle de BMAA sur l'ensemble des côtes françaises métropolitaines. Pour cela, nous avons bénéficié du système de vigilance du réseau de surveillance du REPHY. Ainsi, nous avons pu analyser des glandes digestives de 74 moules et 23 huîtres prélevées, mensuellement en 2013, sur neuf zones de production de bivalves représentatives de l'ensemble du littoral. En parallèle, nous avons recueilli les données REPHY concernant les populations phytoplanctoniques retrouvées proches de ces zones de production.

La BMAA et du DAB ont été retrouvés dans 100 % des mollusques. Ces résultats sont assez surprenants puisque les coquillages ont été prélevés dans des zones différentes, soumises à des conditions climatiques et des assemblages de microalgues divers. De plus, les concentrations de BMAA variaient peu au cours des saisons, même en hiver lorsque l'abondance du phytoplancton est très faible. Nous n'avons pas observé de lien particulier entre les concentrations de BMAA et les microalgues retrouvées dans leur environnement. Cependant et comme à Thau, les diatomées dominent largement les populations phytoplanctoniques, notamment *Chaetoceros* spp. (*i.e.* nous avons détecté de la BMAA dans deux des trois souches de *Chaetoceros* que nous avons criblées, et un groupe suédois dans une autre). Cependant, nous ne savons pas si cette diatomée représente une part importante de

l'alimentation des bivalves en France. En effet, Picoche et al. (2014) estiment que *Chaetoceros* spp. n'ont que faiblement contribué à la croissance des moules en Normandie, à l'inverse de *Dytium* spp. dans lesquelles les suédois ont néanmoins rapporté de la BMAA (Lage et al., 2015b).

Par ailleurs, au cours de ces travaux de thèse, nous avons eu l'opportunité d'analyser des moules d'eau douce prélevées dans l'environnement (*i.e.* *Dreissena polymorpha*). Dans ces organismes, aucune BMAA n'a été retrouvée, ni le composé qui interfère avec son identification dans les mollusques marins. Ces résultats (non rapportés dans ce manuscrit) nous semblent cependant importants puisqu'ils soulignent les différences entre les bivalves d'eau douce et marins.

La BMAA a systématiquement été retrouvée dans les huîtres et les moules françaises, et ce quels que soit la saison et l'endroit où elles ont été prélevées. Les concentrations observées sont assez proches, même si les moules semblent contenir davantage de BMAA. Il serait intéressant de poursuivre le criblage des mollusques marins (e.g. autres que huîtres et moules, prélevés en dehors des côtes françaises métropolitaines) pour voir s'ils contiennent également de la BMAA ainsi que d'autres types d'organismes marins consommés par l'Homme (e.g. poissons, crustacés).

Les diatomées pourraient être une source de BMAA pour les mollusques marins (*i.e.* elles peuvent produire de la BMAA et sont abondantes dans les eaux côtières). Cependant, la bioaccumulation dans les mollusques doit être confirmée en conditions contrôlées au laboratoire, et le mécanisme par lequel elle opère doit être élucidé.

Contamination de moules avec *Phaeodactylum tricornutum*, une diatomée productrice de BMAA

Alors que la BMAA et ses isomères ont été rapportés à la fois dans des microalgues et des bivalves qui peuvent s'en nourrir, la bioaccumulation n'a jamais été formellement prouvée en conditions contrôlées (*cf.* chapitre 1 paragraphe 2.9.3.2). Notre plan d'expérience de contamination des moules bleues (*Mytilus edulis*) avec une diatomée produisant de la BMAA comme seule source d'alimentation (*Phaeodactylum tricornutum*) s'est traduit par une augmentation significative de la BMAA (*i.e.* moyenne dans les glandes digestives et les chairs restantes) uniquement dans les moules nourries avec *P. tricornutum* et laissées deux jours supplémentaires dans de l'eau propre après l'exposition. Les résultats de cette première tentative de contamination ne permettent néanmoins pas de conclure quant à

l'accumulation de BMAA par les moules via leur alimentation. En effet, le bilan massique n'explique que partiellement l'augmentation observée.

Cependant, les concentrations de BMAA, DAB et AEG quantifiées dans les moules conservées deux mois après l'expérience étaient proches de celles de départ, suggérant que la décontamination des mollusques pourrait être un processus long. Jusqu'à présent il n'existe pratiquement pas de données sur l'assimilation, la distribution de la BMAA au sein des tissus et sa métabolisation. De plus, l'incorporation de BMAA libre dans les protéines ou la nature de leurs interactions restent à élucider.

La présence continue de BMAA et ses isomères dans les mollusques marins soulève des questions. Leur détection à des concentrations globalement stables après plusieurs semaines dans des moules maintenues en conditions contrôlées (*i.e.* nourries juste deux fois avec *Tisochrysis lutea* ne contenant pas de BMAA) laisse envisager la possibilité que ces molécules seraient constitutives de la matrice mollusques marins. Bien évidemment ce n'est qu'une hypothèse. Pour la tester, il serait intéressant d'analyser des larves ou des naissains de mollusques maintenus en conditions contrôlées.

A ce jour, il y a un biais entre les analyses toxicologiques réalisées et la présence de BMAA dans les ressources alimentaires (*i.e.* peu d'expositions par voie orales et systématiquement en utilisant de la BMAA « libre » alors qu'elle est très majoritairement retrouvée sous forme associée aux protéines dans les organismes). De plus, très peu de données toxicologiques existent pour le DAB, alors qu'on le retrouve plus fréquemment, et surtout sous forme libre contrairement à la BMAA. De plus, le lien entre la BMAA et les maladies neurodégénératives doit être indiscutablement prouvé vu la présence significative de cet acide aminé dans les mollusques marins, notamment en France. Alors qu'autour de l'étang de Thau un cluster de SLA a été observé, il serait intéressant d'étudier la prévalence de la maladie chez des conchyliculteurs d'autres zones de production, en France et ailleurs (e.g. mer Baltique). Néanmoins, les données générées dans le cadre de ces travaux de thèse pourront être utiles aux autorités publiques chargées de la gestion des risques sanitaires sur le littoral métropolitain.

Evaluation de la présence potentielle des cyanotoxines lipophiles et hydrophiles dans les mollusques marins, après mise en place d'une procédure analytique par CL-SM/SM.

Indépendamment de la «problématique BMAA», il était intéressant de faire un état des lieux de la présence de cyanotoxines dans les mollusques marins en provenance de différentes zones de production françaises. En effet, la littérature ne fait pas état d'une évaluation de la présence dans les eaux côtières françaises des cyanotoxines déjà répertoriées dans l'eau douce. C'est pourquoi, nous

avons développé dans un premier temps une procédure d'analyse multi-cyanotoxines CL-SM/SM utilisant deux méthodes : i) une pour les cyanotoxines hydrophiles (ATXs, CYNs, STX par chromatographie HILIC) ; ii) une pour les cyanotoxines lipophiles (MCs et NOD par chromatographie en phase inverse). Les deux méthodes ont été caractérisées pour l'analyse des matrices de cyanobactérie marine, huître et moule. De très bonnes performances (*i.e.* sensibilité et effet matrice) ont été obtenues pour la méthode lipophile. Concernant l'analyse des cyanotoxines hydrophiles, des effets matrices importants ont été observés (*i.e.* suppression de signal et décalage du temps de rétention). C'est pourquoi il faudrait évaluer l'effet d'une étape de purification ou l'emploi d'une autre colonne chromatographique (e.g. Zic-HILIC).

L'utilisation de ces deux méthodes pour analyser une centaine d'échantillons d'organismes marins a conduit aux conclusions suivantes : i) l'absence de cyanotoxines recherchées dans les moules ; ii) la présence de la cylindrospermopsine et son analogue la désoxycylindrospermopsine dans certains biofilms (periphytons) collectés entre 2013 et 2014 dans la lagune de Thau, en Méditerranée. Bien que l'organisme producteur doive être précisément identifié, ces résultats confirment que les cyanobactéries benthiques marines pourraient être la source majeure de cyanotoxines dans l'environnement marin. Rappelons que ces résultats ont porté sur la recherche uniquement des cyanotoxines présentes sous la forme libre alors que certaines microcystines ont la capacité à s'associer aux protéines phosphatases. Par conséquent, il faudrait effectuer une oxydation de Lemieux pour évaluer la présence de microcystines liées dans les moules (*i.e.* la proportion de MCs liées peut correspondre à plus de 99 % de la quantité totale de MCs). L'évaluation de la présence de cyanotoxine sur le littoral français devrait donc être poursuivie. A cet effet, les méthodes de criblage utilisant la spectrométrie de masse haute résolution développées par le laboratoire Phycotoxines d'Ifremer pourraient s'avérer particulièrement utiles (*i.e.* confrontation des résultats à des bases de données pour l'identification d'un grand nombre potentiel de cyanotoxines grâce à leur masse exacte). De plus, il serait intéressant de déployer des échantillonneurs passifs (e.g. SPATTS, Solid Phase Adsorption Toxin Tracking) qui ont permis la détection de microcystines dissoutes à l'interface terre-mer en baie de Monterey, Californie (Gibble and Kudela., 2014). Enfin, il serait judicieux de privilégier les zones estuariennes soumises à un transfert eau douce/eau de mer de cyanobactéries potentiellement toxiques, ou encore celles subissant des rejets de pompages ou des lâchers d'eau de barrage (e.g. anse de Morieux, lac d'Hossegor).

Valorisation scientifique

Publications acceptées

Réveillon, D., E. Abadie, V. Sechet, L. Brient, V. Savar, M. Bardouil, P. Hess and Z. Amzil (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 12(11): 5441-5467.

Réveillon, D., E. Abadie, V. Séchet, E. Masseret, P. Hess and Z. Amzil (2015). " β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea." Marine Environmental Research 110: 8-18.

Publication soumise

2015 Réveillon, D., Sechet, V., Hess, P., Amzil, Z. *Systematic detection of BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in nine bivalve production areas from the French coasts.* Toxicon.

Publications en préparation

201X Réveillon, D., Mondegue, F., Sechet, V., Hess, P., Amzil, Z. (à soumettre). *BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid): production kinetics by four diatom species and contamination experiment of *Mytilus edulis*.* Harmful Algae.

201X Réveillon, D., Savar, V., Sechet, V., Hess, P., Amzil, Z. (en préparation). *Screening of marine mollusk and periphyton matrices using simultaneously two liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the target analysis of lipophilic and hydrophilic cyanotoxins.* Analytical and Bioanalytical Chemistry.

201X Lance, E., Réveillon, D., et al. (en préparation) *Accumulation of dissolved BMAA in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*.*

Communications orales

- 2015 Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Brient, L., Hess, P., Amzil, Z. *Accumulation de BMAA et isomères dans les bivalves marins en France*
Séminaire sur la Sclérose Latérale Amyotrophique organisé par le neurologue William Camu, Saintes-Maries-de-la-Mer, 3 septembre 2015.
- 2015 Réveillon, D., Abadie, E., Savar, V., Séchet, V., Bardouil, M., Masseret, E., Brient, L., Hess, P., Amzil, Z. *BMAA and isomers in samples from Thau lagoon and in mollusks from other French coasts (Channel, Atlantic and Mediterranean sites).*
Conférence GdR Phycotox - GIS Cyanobactéries, Brest, 31 mars-2 avr. 2015.
- 2014 Réveillon, D., Abadie, E., Sechet, V., Savar, V., Bardouil, M., Brient, L., Hess, P., Amzil, Z. *BMAA and isomers in French coastal environmental samples and cyanobacterial cultures.*
11th International Conference on Plant Medicine, Jackson Hole, WY, USA, 10-17 Octobre 2014.
- 2014 Réveillon, D., Abadie, E., Sechet, V., Savar, V., Bardouil, M., Brient, L., Hess, P., Amzil, Z. *BMAA : Optimisation de l'identification de BMAA libre et criblage d'échantillons biologiques.*
GIS Cyanobactéries, Parent (63), 24-25 mars 2014.
- 2013 Réveillon, D., Abadie, E., Sechet, V., Savar, V., Bardouil, M., Brient, L., Hess, P., Amzil, Z. *Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA): Optimization of identification and quantification in biological samples.*
21st Meeting of the French Society of Toxinology (SFET): Freshwater and Marine Toxins. Institut Pasteur, Paris, 9-10 Décembre 2013.
- 2012 Reveillon, D., Brient, L., Sechet. V., Amzil, Z. *BMAA : Cyanobactéries productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins.*
GIS Cyanobactéries, Chamarande (91), 10-12 Décembre 2012.

Poster

- 2014 Reveillon, D., Savar, V., Sechet, V., Bardouil, M., Brient, L., Amzil, Z. *Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA): Optimization of LC-MS/MS analysis in extracts of cyanobacteria.*
3èmes Journées scientifiques de l'école doctorale VENAM, Le Mans, 20-21 Janvier 2014.

Références

- Abdennadher, M., **2014**. Étude Taxonomique & Écophysiologique des dinoflagellés toxiques du Golfe de Gabès : *Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima*, *Coolia* spp. & *Ostreopsis ovata*, laboratoire du Milieu Marin en collaboration avec le laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie marine à l'Institut National des Sciences et des Technologie de la Mer, centre de Sfax et la Goulette. Université de Sfax, p. 372.
- Abrantes, N., Antunes, S.C., Pereira, M.J., Goncalves, F., **2006**. Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecol.-Int. J. Ecol.* 29 (1), 54-64.
- Al-Sammak, M.A., Hoagland, K.D., Cassada, D., Snow, D.D., **2014**. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins* 6 (2), 488-508.
- Al-Tebrineh, J., Mihali, T.K., Pomati, F., Neilan, B.A., **2010**. Detection of Saxitoxin-Producing Cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in Environmental Water Blooms by Quantitative PCR. *Appl Environ Microb* 76 (23), 7836-7842.
- Al-Tebrineh, J., Pearson, L.A., Yasar, S.A., Neilan, B.A., **2012**. A multiplex qPCR targeting hepato- and neurotoxic cyanobacteria of global significance. *Harmful Algae* 15 19-25.
- Alpert, A.J., **1990**. Hydrophilic-Interaction Chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *Journal of chromatography* 499 177-196.
- ALSAssociation, **2015a**. The ALS Association Expresses Sincere Gratitude to Over Three Million Donors, <http://www.alsa.org/news/media/press-releases/ice-bucket-challenge-082914.html>. Last accessed July 20, 2015.
- ALSAssociation, **2015b**. What is ALS?, <http://www.alsa.org/about-als/what-is-als.html>. Last accessed July 20, 2015.
- Amin, S.A., Parker, M.S., Armbrust, E.V., **2012**. Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol Mol Biol R* 76 (3), 667-684.
- Amorim, A., Vasconcelos, V., **1999**. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 37 (7), 1041-1052.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., Abadie, E., **2007**. Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine Drugs* 5 (4), 168-179.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Savar, V., **2008**. First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish. *Toxicon* 52 (1), 39-48.
- Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M., **2012**. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14 (0), 10-35.
- Andersson, M., Karlsson, O., Bergstrom, U., Brittebo, E.B., Brandt, I., **2013**. Maternal Transfer of the Cyanobacterial Neurotoxin beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) via Milk to Suckling Offspring. *Plos One* 8 (10).
- Andrys, R., Zurita, J., Zguna, N., Verschueren, K., De Borggraeve, W.M., Ilag, L.L., **2015**. Improved detection of beta-N-methylamino-L-alanine using N-hydroxysuccinimide ester of N-butylnicotinic acid for the localization of BMAA in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Anal Bioanal Chem* 407 (13), 3743-3750.
- Aranda-Rodriguez, R., Jin, Z., Harvie, J., Cabecinha, A., **2015**. Evaluation of three field test kits to detect microcystins from a public health perspective. *Harmful Algae* 42 (0), 34-42.
- Aranda-Rodriguez, R., Kubwabo, C., Benoit, F.M., **2003**. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon* 42 (6), 587-599.

- Aráoz, R., Herdman, M., Rippka, R., Ledreux, A., Molgó, J., Changeux, J.P., Tandeau de Marsac, N., Nghiêm, H.O., **2008**. A non-radioactive ligand-binding assay for detection of cyanobacterial anatoxins using Torpedo electrocyte membranes. *Toxicon* 52 (1), 163-174.
- Araoz, R., Molgo, J., Tandeau de Marsac, N., **2010**. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56 (5), 813-828.
- Araoz, R., Nghiêm, H.O., Rippka, R., Palibroda, N., Tandeau de Marsac, N., Herdman, M., **2005**. Neurotoxins in axenic oscillatorian cyanobacteria: coexistence of anatoxin-alpha and homoanatoxin-alpha determined by ligand-binding assay and GC/MS. *Microbiol-Sgm* 151 1263-1273.
- Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kröger, N., Lau, W.W.Y., Lane, T.W., Larimer, F.W., Lippmeier, J.C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S., Palenik, B., Pazour, G.J., Richardson, P.M., Ryneerson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S., **2004**. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* 306 (5693), 79-86.
- Azevedo, S., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., **2002**. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 181 441-446.
- Backer, L., Manassaram-Baptiste, D., LePrell, R., Bolton, B., **2015**. Cyanobacteria and Algae Blooms: Review of Health and Environmental Data from the Harmful Algal Bloom-Related Illness Surveillance System (HABISS) 2007–2011. *Toxins* 7 (4), 1048-1064.
- Backer, L.C., Carmichael, W., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B., Nierenberg, K., Hill, V.R., Kieszak, S.M., Cheng, Y.S., **2008**. Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. *Marine Drugs* 6 (2), 389-406.
- Backer, L.C., Landsberg, J.H., Miller, M., Keel, K., Taylor, T.K., **2013**. Canine Cyanotoxin Poisonings in the United States (1920s-2012): Review of Suspected and Confirmed Cases from Three Data Sources. *Toxins* 5 (9), 1597-1628.
- Backer, L.C., McNeel, S.V., Barber, T., Kirkpatrick, B., Williams, C., Irvin, M., Zhou, Y., Johnson, T.B., Nierenberg, K., Aubel, M., LePrell, R., Chapman, A., Foss, A., Corum, S., Hill, V.R., Kieszak, S.M., Cheng, Y.-S., **2010**. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* 55 (5), 909-921.
- Baker, L., Sendall, B.C., Gasser, R.B., Menjivar, T., Neilan, B.A., Jex, A.R., **2013**. Rapid, multiplex-tandem PCR assay for automated detection and differentiation of toxigenic cyanobacterial blooms. *Molecular and Cellular Probes* 27 (5-6), 208-214.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., **2004**. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya—Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita. *Journal of Plankton Research* 26 (8), 925-935.
- Ballot, A., Sandvik, M., Rundberget, T., Botha, C.J., Miles, C.O., **2014**. Diversity of cyanobacteria and cyanotoxins in Hartbeespoort Dam, South Africa. *Mar Freshwater Res* 65 (2), 175-189.
- Banack, S., Johnson, H., Cheng, R., Cox, P., **2007**. Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium. *Marine Drugs* 5 (4), 180-196.
- Banack, S.A., Caller, T., Henegan, P., Haney, J., Murby, A., Metcalf, J.S., Powell, J., Cox, P.A., Stommel, E., **2015**. Detection of Cyanotoxins, beta-N-methylamino-L-alanine and Microcystins, from a Lake Surrounded by Cases of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins* 7 (2), 322-336.
- Banack, S.A., Caller, T.A., Stommel, E.W., **2010a**. The Cyanobacteria Derived Toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins* 2 (12), 2837-2850.
- Banack, S.A., Downing, T.G., Spáčil, Z., Purdie, E.L., Metcalf, J.S., Downing, S., Esterhuizen, M., Codd, G.A., Cox, P.A., **2010b**. 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, S.A., Metcalf, J.S., Bradley, W.G., Cox, P.A., **2014**. Detection of cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine within shellfish in the diet of an ALS patient in Florida. *Toxicon* 90 (0), 167-173.
- Banack, S.A., Metcalf, J.S., Jiang, L., Craighead, D., Ilag, L.L., Cox, P.A., **2012**. Cyanobacteria produce N-(2-aminoethyl)glycine, a backbone for Peptide nucleic acids which may have been the first genetic molecules for life on Earth. *PLoS one* 7 (11), e49043-e49043.
- Banack, S.A., Metcalf, J.S., Spacil, Z., Downing, T.G., Downing, S., Long, A., Nunn, P.B., Cox, P.A., **2011**. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon* 57 (5), 730-738.
- Banack, S.A., Murch, S.J., Cox, P.A., **2006**. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 106 (1), 97-104.
- Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., **2001**. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *J. Toxicol. Env. Health Pt A* 62 (4), 281-288.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., Carmeli, S., **2000**. 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *J Nat Prod* 63 (3), 387-389.
- Baptista, M.S., Vasconcelos, R.G.W., Ferreira, P.C., Almeida, C.M.R., Vasconcelos, V.M., **2015**. Assessment of the non-protein amino acid BMAA in Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* after feeding with estuarine cyanobacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (16), 12501-12510.
- Barco, M., Lawton, L.A., Rivera, J., Caixach, J., **2005**. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1074 (1-2), 23-30.
- Barda, I., Kankaanpää, H., Purina, I., Balode, M., Sjövall, O., Meriluoto, J., **2015**. Bioaccumulation of hepatotoxins - A considerable risk in the Latvian environment. *Environ Pollut* 196 313-320.
- Barón-Sola, Á., Ouahid, Y., del Campo, F.F., **2012**. Detection of potentially producing cylindrospermopsin and microcystin strains in mixed populations of cyanobacteria by simultaneous amplification of cylindrospermopsin and microcystin gene regions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75 (0), 102-108.
- Bates, S.S., Douglas, D.J., Doucette, G.J., Leger, C., **1995**. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Nat Toxins* 3 (6), 428-435.
- Bates, S.S., Trainer, V.L., **2006**. The Ecology of Harmful Diatoms, in: Granéli, E., Turner, J. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 81-93.
- Bayne, B.L., Worrall, C.M., **1980**. Growth and Production of Mussels *Mytilus-Edulis* from 2 Populations. *Mar Ecol Prog Ser* 3 (4), 317-328.
- Belin, C., Neaud-Masson, N., **2012**. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013. Ifremer. http://envlit.ifremer.fr/content/download/81386/558742/file/Cahier_REPHY_2012_version_finale_12_sep_%202012.pdf
- Bellinger, B.J., Hagerthey, S.E., **2010**. Presence and diversity of algal toxins in subtropical peatland periphyton: the Florida Everglades, USA. *Journal of Phycology* 46 (4), 674-678.
- Berntzon, L., Erasmie, S., Celepli, N., Eriksson, J., Rasmussen, U., Bergman, B., **2013**. BMAA Inhibits Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Marine Drugs* 11 (8), 3091-3108.
- Berntzon, L., Ronnevi, L.O., Bergman, B., Eriksson, J., **2015**. Detection of BMAA in the human central nervous system. *Neuroscience* 292 (0), 137-147.
- Berry, J.P., Lind, O., **2010**. First evidence of "paralytic shellfish toxins" and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in "tegogolo" snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon* 55 (5), 930-938.

- Black, K., Yilmaz, M., Philips, E., **2011**. Growth and Toxin Production by *Microcystis Aeruginosa* PCC 7806 (Kutzing) Lemmerman at Elevated Salt Concentrations. Journal of Environmental Protection 2 (6), 669-674.
- Blanco, J., Acosta, C.P., Bermúdez de la Puente, M., Salgado, C., **2002**. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. Aquatic Toxicology 60 (1–2), 111-121.
- Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P., **2007**. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon 50 (8), 1011-1018.
- Bogialli, S., Bruno, M., Curini, R., Di Corcia, A., Laganà, A., **2006**. Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1122 (1–2), 180-185.
- Bolch, C.J.S., Blackburn, S.I., Neilan, B.A., Grewe, P.M., **1999**. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions. Journal of Phycology 32 (3), 445-451.
- Bortoli, S., Volmer, D.A., **2014**. Account Characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. European Journal of Mass Spectrometry 20 (1), 1-19.
- Boundy, M.J., Selwood, A.I., Harwood, D.T., McNabb, P.S., Turner, A.D., **2015**. Development of a sensitive and selective liquid chromatography–mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. Journal of Chromatography A 1387 (0), 1-12.
- Bourke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A., Stallman, N.D., **1983**. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. Toxicon 3 45-48.
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kroger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jezequel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Oudot-Le Secq, M.P., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Ryneerson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Saut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van De Peer, Y., Grigoriev, I.V., **2008**. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. Nature 456 (7219), 239-244.
- Bradley, W.G., Borenstein, A.R., Nelson, L.M., Codd, G.A., Rosen, B.H., Stommel, E.W., Cox, P.A., **2013**. Is exposure to cyanobacteria an environmental risk factor for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases? Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration.
- Bradley, W.G., Mash, D.C., **2009**. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10 Suppl 2 7-20.
- Brand, L.E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D.C., **2010**. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs. Harmful Algae 9 (6), 620-635.
- Brenner, E.D., Stevenson, D.W., McCombie, R.W., Katari, M.S., Rudd, S.A., Mayer, K.F.X., Palenchar, P.M., Runko, S.J., Twigg, R.W., Dai, G.W., Martienssen, R.A., Benfey, P.N., Coruzzi, G.M., **2003**. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. Genome Biology 4 (12).

- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., Anderson, D.M., **1990**. Uptake kinetics of Paralytic Shellfish Toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fudyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Mar Ecol Prog Ser 63 (2-3), 177-188.
- Bricelj, V.M., Shumway, S.E., **1998**. Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Molluscs: Occurrence, Transfer Kinetics, and Biotransformation. Reviews in Fisheries Science 6 315-383.
- Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J., **2009**. First Occurrence of Cylindrospermopsin in Freshwater in France. Environmental Toxicology 24 (4), 415-420.
- Brito, A., Gaifem, J., Ramos, V., Glukhov, E., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., Vasconcelos, V.M., Mendes, M.V., Tamagnini, P., **2015**. Bioprospecting Portuguese Atlantic coast cyanobacteria for bioactive secondary metabolites reveals untapped chemodiversity. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts 9 218-226.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., **1997**. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151 (1-4), 315-331.
- Brownson, D.M., Mabry, T.J., Leslie, S.W., **2002**. The cycad neurotoxic amino acid, β -N-methylamino-l-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. Journal of Ethnopharmacology 82 (2-3), 159-167.
- Bumke-Vogt, C., Mailahn, W., Chorus, I., **1999**. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. Environmental Toxicology 14 (1), 117-125.
- Bureau, S., Zebuhr, Y., Broman, D., Ishaq, R., **2006**. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. Sci Total Environ 366 (2-3), 659-672.
- Cadel-Six, S., Moyenga, D., Magny, S., Trotereau, S., Edery, M., Krys, S., **2014**. Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Method characterization. Environ Pollut 185 (0), 333-339.
- Capone, D.G., Zehr, J.P., Paerl, H.W., Bergman, B., Carpenter, E.J., **1997**. Trichodesmium, a globally significant marine cyanobacterium. Science 276 (5316), 1221-1229.
- Cardellina, J., Marner, F., Moore, R., **1979**. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. Science 204 (4389), 193-195.
- Carlier, A., Riera, P., Amouroux, J.M., Bodiou, J.Y., Desmalades, M., Grémare, A., **2009**. Spatial heterogeneity in the food web of a heavily modified Mediterranean coastal lagoon: stable isotope evidence. Aquatic Biology 5 (2), 167-179.
- Carmichael, W.W., **2001**. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". Human and Ecological Risk Assessment 7 (5), 1393-1407.
- Carmichael, W.W., Beasley, V., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K.I., Krishnamurthy, T., Yu, M.J., Moore, R.E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O.M., Watanabe, M., **1988**. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon 26 (11), 971-973.
- Carmichael, W.W., Biggs, D.F., Peterson, M.A., **1979**. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos aquae* NRC-44-1. Toxicon 17 (3), 229-236.
- Carrasco, D., Moreno, E., Sanchis, D., Wörmer, L., Paniagua, T., Del Cueto, A., Quesada, A., **2006**. Cyanobacterial abundance and microcystin occurrence in Mediterranean water reservoirs in Central Spain: microcystins in the Madrid area. Eur J Phycol 41 (3), 281-291.
- Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Stabili, L., **2009**. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). Environmental monitoring and assessment 149 (1-4), 465-475.
- Cervantes Cianca, R., Baptista, M., Lopes, V., Vasconcelos, V., **2012**. The non-protein amino acid β -N-methylamino-l-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates. Amino Acids 42 (6), 2473-2479.
- Cestele, S., Catterall, W.A., **2000**. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 82 (9-10), 883-892.

- Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D.M., Lu, Z., Mazzeo, J.R., **2007**. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. Journal of Chromatography B 852 (1–2), 22–34.
- Chen, D.Z.X., Boland, M.P., Smillie, M.A., Klix, H., Ptak, C., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B., **1993**. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. Toxicon 31 (11), 1407–1414.
- Chen, J., Xie, P., **2005a**. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. Environmental Toxicology 20 (6), 572–584.
- Chen, J., Xie, P., **2005b**. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. Toxicon 45 (5), 615–625.
- Chen, J., Xie, P., Guo, L.G., Zheng, L., Ni, L.Y., **2005**. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in a freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. Environ Pollut 134 (3), 423–430.
- Chen, J., Xie, P., Zhang, D.W., Lei, H.H., **2007**. In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish - bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Environ Pollut 147 (1), 150–157.
- Chen, J.J., Yan, T.T., Xu, J.L., He, S., Zhao, P., Yan, X.J., **2012**. Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. J Sep Sci 35 (9), 1094–1101.
- Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Fouc, M.T., Revel, T., Cruchet, P., Pauillac, S., Laurent, D., **2010**. Ciguatera risk management in French Polynesia: The case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). Toxicon 56 (5), 674–690.
- Chirita, R.-I., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A.-L., Elfakir, C., **2011**. Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. Journal of Chromatography A 1218 (35), 5939–5963.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., **1999**. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. Environmental Toxicology 14 (1), 155–161.
- Chiu, A.S., Braid, N., Marcal, H., Welch, J.H., Gehringer, M.M., Guillemin, G.J., Neilan, B.A., **2015**. Global cellular responses to beta-methyl-amino-L-alanine (BMAA) by olfactory ensheathing glial cells (OEC). Toxicon 99 136–145.
- Chiu, A.S., Gehringer, M.M., Braid, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H., Neilan, B.A., **2012**. Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. Toxicon 60 (6), 1159–1165.
- Chiu, A.S., Gehringer, M.M., Braid, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H., Neilan, B.A., **2013**. Gliotoxicity of the cyanotoxin, beta-methyl-amino-(L)-alanine (BMAA). Sci Rep-Uk 3.
- Chiu, A.S., Gehringer, M.M., Welch, J.H., Neilan, B.A., **2011**. Does alpha-Amino-beta-methylaminopropionic Acid (BMAA) Play a Role in Neurodegeneration? Int J Env Res Pub He 8 (9), 3728–3746.
- Chorus, I., **2012**. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency.
- Chorus, I., Bartram, J., **1999**. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization.
- Christensen, S.J., Hemscheidt, T.K., Trapido-Rosenthal, H., Laws, E.A., Bidigare, R.R., **2012**. Detection and quantification of beta-methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography-Methods 10 891–898.

- Chu, F.L.E., Soudant, P., Hale, R.C., **2003**. Relationship between PCB accumulation and reproductive output in conditioned oysters *Crassostrea virginica* fed a contaminated algal diet. Aquatic Toxicology 65 (3), 293-307.
- Claisse, D., Raffin, B., **2010**. Surveillance chimique ROCCH - Inventaire cartographique des points de prélèvements ROCCH échantillonnés au titre de la surveillance sanitaire.
- CNC, **2010**. CNC-Comité National de la Conchyliculture, <http://www.cnc-france.com/index.php?rub=2>. Last accessed January 6, 2015.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., **2005**. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. Toxicology and Applied Pharmacology 203 (3), 264-272.
- Cohen, S.A., **2012**. Analytical techniques for the detection of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. Analyst 137 (9), 1991-2005.
- Combes, A., El Abdellaoui, S., Sarazin, C., Vial, J., Mejean, A., Ploux, O., Pichon, V., group, B., **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., group, B., **2014**. Development of an analytical procedure for quantifying the underivatized neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine in brain tissues. Anal Bioanal Chem 406 (19), 4627-4636.
- Contardo-Jara, V., Funke, M.S., Peuthert, A., Pflugmacher, S., **2013**. beta-N-Methylamino-L-alanine exposure alters defense against oxidative stress in aquatic plants *Lomariopsis lineata*, *Fontinalis antipyretica*, *Riccia fluitans* and *Taxiphyllum barbieri*. Ecotoxicology and environmental safety 88 72-78.
- Contardo-Jara, V., Otterstein, S.K.B., Downing, S., Downing, T.G., Pflugmacher, S., **2014**. Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (*Dreissena polymorpha*, *Anadonta cygnea*, *Unio tumidus*, and *Corbicula javanicus*) to the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine. Toxicol Environ Chem 96 (3), 451-465.
- Conti, A.L.R., Guerrero, J.M., Regueira, J.M., **2005**. Levels of microcystins in two argentinean reservoirs used for water supply and recreation: Differences in the implementation of safe levels. Environmental Toxicology 20 (3), 263-269.
- Corbel, S., Mougin, C., Bouaicha, N., **2014**. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. Chemosphere 96 1-15.
- Costa, M.S., Costa, M., Ramos, V., Leao, P.N., Barreiro, A., Vasconcelos, V., Martins, R., **2015**. Picocyanobacteria From a Clade of Marine Cyanobium Revealed Bioactive Potential Against Microalgae, Bacteria, and Marine Invertebrates. Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues 78 (7), 432-442.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., **2003**. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (23), 13380-13383.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., **2005**. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (14), 5074-5078.
- Cox, P.A., Richer, R., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Codd, G.A., Bradley, W.G., **2009**. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: A possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. Amyotrophic Lateral Sclerosis 10 (s2), 109-117.
- Cruz-Aguado, R., Winkler, D., Shaw, C.A., **2006**. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary β -methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior 84 (2), 294-299.
- Cusick, K.D., Sayler, G.S., **2013**. An Overview on the Marine Neurotoxin, Saxitoxin: Genetics, Molecular Targets, Methods of Detection and Ecological Functions. Marine Drugs 11 (4), 991-1018.

- Dagenais-Bellefeuille, S., Morse, D., **2013**. Putting the N in dinoflagellates. Frontiers in Microbiology 4.
- Dahl, B., Blanck, H., **1996**. Toxic effects of the antifouling agent irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. Mar Pollut Bull 32 (4), 342-350.
- Dahlmann, J., Budakowski, W.R., Luckas, B., **2003**. Liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. Journal of Chromatography A 994 (1-2), 45-57.
- Deblois, C.P., Aranda-Rodrigues, R., Gianic, A., Bird, D.F., **2008**. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. Toxicon 5 435-448.
- DeGrasse, S.L., van de Riet, J., Hatfield, R., Turner, A., **2011**. Pre- versus post-column oxidation liquid chromatography fluorescence detection of paralytic shellfish toxins. Toxicon 57 (4), 619-624.
- Dell'Aversano, C., Eaglesham, G.K., Quilliam, M.A., **2004**. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1028 (1), 155-164.
- Dell'Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M.A., **2005**. Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. Journal of Chromatography A 1081 (2), 190-201.
- Delwiche, C.F., **1999**. Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. Am. Nat. 154 S164-S177.
- Delzor, A., Couratier, P., Boumediene, F., Nicol, M., Druet-Cabanac, M., Paraf, F., Mejean, A., Ploux, O., Leleu, J.P., Brient, L., Lengronne, M., Pichon, V., Combes, A., El Abdellaoui, S., Bonnetterre, V., Lagrange, E., Besson, G., Bicout, D.J., Boutonnat, J., Camu, W., Pageot, N., Juntas-Morales, R., Rigau, V., Masseret, E., Abadie, E., Preux, P.M., Marin, B., **2014**. Searching for a link between the L-BMAA neurotoxin and amyotrophic lateral sclerosis: a study protocol of the French BMAALS programme. BMJ open 4 (8), e005528.
- Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K., Stavric, B., **1977**. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena-flos aquae* NRC-44H. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie 55 (8), 1367-1371.
- Devlin, S., Meneely, J.P., Greer, B., Greef, C., Lochhead, M.J., Elliott, C.T., **2013**. Next generation planar waveguide detection of microcystins in freshwater and cyanobacterial extracts, utilising a novel lysis method for portable sample preparation and analysis. Anal Chim Acta 769 (0), 108-113.
- Dietrich, D., Hoeger, S., **2005**. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? Toxicology and Applied Pharmacology 203 (3), 273-289.
- Dittmann, E., Fewer, D.P., Neilan, B.A., **2013**. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. Fems Microbiol Rev 37 (1), 23-43.
- Dittmann, E., Wiegand, C., **2006**. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. Molecular Nutrition & Food Research 50 (1), 7-17.
- Doerr, F.A., Rodriguez, V., Molica, R., Henriksen, P., Krock, B., Pinto, E., **2010**. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Toxicon 55 (1), 92-99.
- Doucette, G.J., **1995**. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. Nat Toxins 3 (2), 65-74.
- Downing, S., Banack, S.A., Metcalf, J.S., Cox, P.A., Downing, T.G., **2011**. Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of β -N-methylamino-L-alanine. Toxicon 58 (2), 187-194.
- Downing, S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Downing, T.G., **2014**. The fate of the cyanobacterial toxin beta-N-methylamino-L-alanine in freshwater mussels. Ecotoxicology and Environmental Safety 101 51-58.

- Downing, S., van de Venter, M., Downing, T.G., **2012**. The Effect of Exogenous beta-N-Methylamino-L-alanine on the Growth of Synechocystis PCC6803. Microb Ecol 63 (1), 149-156.
- Downing, T.G., Phelan, R.R., Downing, S., **2015**. A potential physiological role for cyanotoxins in cyanobacteria of arid environments. J Arid Environ 112 147-151.
- Dubois, S., Blanchet, H., Garcia, A., Masse, M., Galois, R., Gremare, A., Charlier, K., Guillou, G., Richard, P., Savoye, N., **2014**. Trophic resource use by macrozoobenthic primary consumers within a semi-enclosed coastal ecosystem: Stable isotope and fatty acid assessment. Journal of Sea Research 88 87-99.
- Dubois, S., Orvain, F., Marin-Leal, J.C., Ropert, M., Lefebvre, S., **2007**. Small-scale spatial variability of food partitioning between cultivated oysters and associated suspension-feeding species, as revealed by stable isotopes. Mar Ecol Prog Ser 336 151-160.
- Duncan, M.W., **2012**. Good mass spectrometry and its place in good science. Journal of Mass Spectrometry 47 (6), 795-809.
- Duncan, M.W., Kopin, I.J., Garruto, R.M., Lavine, L., Markey, S.P., **1988**. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad-derived foods is an unlikely cause of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism. The Lancet 332 (8611), 631-632.
- Duncan, M.W., Steele, J.C., Kopin, I.J., Markey, S.P., **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 (5), 767-772.
- Duncan, M.W., Villacreses, N.E., Pearson, P.G., Wyatt, L., Rapoport, S.I., Kopin, I.J., Markey, S.P., Smith, Q.R., **1991**. 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. J Pharmacol Exp Ther 258 (1), 27-35.
- Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., **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).
- Dunstan, G.A., Brown, M.R., Volkman, J.K., **2005**. Cryptophyceae and rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. Phytochemistry 66 (21), 2557-2570.
- Dupuy, C., Vaquer, A., Lam-Hoi, T., Rougier, C., Mazouni, N., Lautier, J., Collos, Y., Le Gall, S., **2000**. Feeding rate of the oyster Crassostrea gigas in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. Mar Ecol Prog Ser 205 171-184.
- Dziga, D., Wasylewski, M., Wladyka, B., Nybom, S., Meriluoto, J., **2013**. Microbial Degradation of Microcystins. Chem Res Toxicol 26 (6), 841-852.
- EFSA, **2009**. Marine biotoxins in shellfish - Summary on regulated marine biotoxins, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. Adopted on 13 August 2009. The EFSA Journal 1306, pp. 1-23.
- El Ghazali, I., Saqrane, S., Saker, M., Youness, O., Oudra, B., Vasconcelos, V., Del Campo, S., **2011**. Caractérisation biochimique et moléculaire d'efflorescences à cyanobactéries toxiques dans le réservoir Lalla Takerkoust (Maroc). J. Water Sc. 24 117-128.
- El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A.J.-B., Bouaïcha, N., **2008**. Seasonal occurrence and toxicity of Microcystis spp. and Oscillatoria tenuis in the Lebna Dam, Tunisia. Water Research 42 (4-5), 1263-1273.
- EPA, **2015**. Drinking Water Health Advisories for Two Cyanobacterial Toxins.
- Eriksson, J., Jonasson, S., Papaefthimiou, D., Rasmussen, U., Bergman, B., **2009**. Improving derivatization efficiency of BMAA utilizing AccQ-Tag® in a complex cyanobacterial matrix. Amino Acids 36 (1), 43-48.
- Esterhuizen-Londt, M., Downing, S., Downing, T.G., **2011a**. Improved sensitivity using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) for detection of propyl chloroformate derivatised beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in cyanobacteria. Water Sa 37 (2), 133-138.
- Esterhuizen-Londt, M., Downing, T.G., **2011**. Solid phase extraction of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from South African water supplies. Water Sa 37 (4), 523-527.

- Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S., Downing, T.G., **2011b**. The effect of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon* 57 (5), 803-810.
- Esterhuizen-Londt, M., Wiegand, C., Downing, T.G., **2015**. beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the animal model, *Daphnia magna* and subsequent oxidative stress. *Toxicon* 100 20-26.
- Esterhuizen, M., Downing, T.G., **2008**. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2), 309-313.
- Ettoumi, A., El Khalloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., Bouaïcha, N., **2011**. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health, in: Kattel, G. (Ed.), *Zooplankton and Phytoplankton: Types, Characteristics and Ecology*. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 1-34.
- Faassen, E.J., **2014**. Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: what do we really know? *Toxins* 6 (3), 1109-1138.
- Faassen, E.J., Gillissen, F., Lüring, M., **2012a**. A Comparative Study on Three Analytical Methods for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Cyanobacteria. *PLoS ONE* 7 (5), e36667.
- Faassen, E.J., Gillissen, F., Zweers, H.A.J., Lüring, M., **2009**. Determination of the neurotoxins BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) and DAB (alpha-gamma-diaminobutyric acid) by LC-MS/MS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10 79-84.
- Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L., Lüring, M., **2012b**. First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon* 60 (3), 378-384.
- Fadel, A., Atoui, A., Lemaire, B.J., Vincon-Leite, B., Slim, K., **2014**. Dynamics of the Toxin Cylindrospermopsin and the Cyanobacterium *Chrysosporum* (Aphanizomenon) ovalisporum in a Mediterranean Eutrophic Reservoir. *Toxins* 6 (11), 3041-3057.
- Falconer, I.R., **1993**. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs, in: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press, London, pp. 165-175.
- Falconer, I.R., **1999**. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14 (1), 5-12.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., **2006**. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology* 21 (4), 299-304.
- Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J.R., **2004**. The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. *Science* 305 (5682), 354-360.
- Fan, H., Qiu, J., Fan, L., Li, A., **2014**. Effects of growth conditions on the production of neurotoxin 2,4-diaminobutyric acid (DAB) in *Microcystis aeruginosa* and its universal presence in diverse cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Environmental Science and Pollution Research* 1-9.
- Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I., **1999**. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology* 14 (1), 13-22.
- Fastner, J., Rucker, J., Stuken, A., Preussel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Kohler, A., Wiedner, C., **2007**. Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in northeast Germany. *Environmental Toxicology* 22 (1), 26-32.
- Fernandes, L.F., Cavalcante, K.P., Proenca, L.A.D., Schramm, M.A., **2013**. Blooms of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* and *P. calliantha*, and associated domoic acid accumulation in shellfish from the South Brazilian coast. *Diatom Research* 28 (4), 381-393.
- Ferrao-Filho, A.d.S., Kozłowsky-Suzuki, B., **2011**. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs* 9 (12), 2729-2772.
- Ferrao, A.D., Kozłowsky-Suzuki, B., **2011**. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine Drugs* 9 (12), 2729-2772.

- Field, N.C., Metcalf, J.S., Caller, T.A., Banack, S.A., Cox, P.A., Stommel, E.W., **2013**. Linking beta-methylamino-L-alanine exposure to sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Annapolis, MD. Toxicon 70 179-183.
- Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., **2005**. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicology and Applied Pharmacology 203 (3), 257-263.
- Fischer, W.J., Garthwaite, I., Miles, C.O., Ross, K.M., Aggen, J.B., Chamberlin, A.R., Towers, N.R., Dietrich, D.R., **2001**. Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins. Environmental science & technology 35 (24), 4849-4856.
- Foss, A.J., Aubel, M.T., **2013**. The extraction and analysis of cylindrospermopsin from human serum and urine. Toxicon 70 54-61.
- Foss, A.J., Philips, E.J., Aubel, M.T., Szabo, N.J., **2012**. Investigation of extraction and analysis techniques for Lyngbya wollei derived Paralytic Shellfish Toxins. Toxicon 60 (6), 1148-1158.
- Fraza, B., Martins, R., Vasconcelos, V., **2010**. Are Known Cyanotoxins Involved in the Toxicity of Picoplanktonic and Filamentous North Atlantic Marine Cyanobacteria? Marine Drugs 8 (6), 1908-1919.
- Frosio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., **2003**. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. Environmental Toxicology 18 (4), 243-251.
- Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Terada, M., Sugimura, T., Moore, R.E., **1981**. Indole alkaloids - dihydroteleocidin-B, teleocidin, and lyngbyatoxin-A as members of a new class of tumor promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences 78 (6), 3872-3876.
- Furey, A., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., James, K.J., **2005**. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. Journal of Chromatography A 1082 (1), 91-97.
- Furey, A., Crowley, J., Shuilleabhain, A.N., Skulberg, A.M., James, K.J., **2003**. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. Toxicon 41 (3), 297-303.
- Gaiser, E.E., McCormick, P.V., Hagerthey, S.E., Gottlieb, A.D., **2011**. Landscape Patterns of Periphyton in the Florida Everglades. Crit Rev Env Sci Tec 41 92-120.
- Galanti, L.N., Ame, M.V., Wunderlin, D.A., **2013**. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp Palaemonetes argentinus. Harmful Algae 27 88-97.
- Gangnery, A., Bacher, C., Buestel, D., **2004**. Application of a population dynamics model to the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis, reared in Thau Lagoon (France). Aquaculture 229 (1-4), 289-313.
- Gangnery, A., Chabirand, J.-M., Lagarde, F., Le Gall, P., Oheix, J., Bacher, C., Buestel, D., **2003**. Growth model of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, cultured in Thau Lagoon (Méditerranée, France). Aquaculture 215 (1-4), 267-290.
- Garcia, A.C., Bargu, S., Dash, P., Rabalais, N.N., Sutor, M., Morrison, W., Walker, N.D., **2010**. Evaluating the potential risk of microcystins to blue crab (Callinectes sapidus) fisheries and human health in a eutrophic estuary. Harmful Algae 9 (2), 134-143.
- Gardes, A., Iversen, M.H., Grossart, H.P., Passow, U., Ullrich, M.S., **2011**. Diatom-associated bacteria are required for aggregation of Thalassiosira weissflogii. Isme J 5 (3), 436-445.
- Garruto, R.M., Gajdusek, D.C., Chen, K.-M., **1980**. Amyotrophic lateral sclerosis among chamorro migrants from guam. Ann Neurol 8 (6), 612-619.
- Gibble, C.M., Kudela, R.M., **2014**. Detection of persistent microcystin toxins at the land-sea interface in Monterey Bay, California. Harmful Algae 39 (0), 146-153.
- Gifford, D.J., **1991**. The Protozoan-Metazoan trophic link in pelagic ecosystems. Journal of Protozoology 38 (1), 81-86.
- Gilroy, D.J., Kauffman, K.W., Hall, R.A., Huang, X., Chu, F.S., **2000**. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. Environmental health perspectives 108 (5), 435-439.

- Glas, M.S., Motti, C.A., Negri, A.P., Sato, Y., Froscio, S., Humpage, A.R., Krock, B., Cembella, A., Bourne, D.G., **2010**. Cyanotoxins are not implicated in the etiology of coral black band disease outbreaks on Pelorus Island, Great Barrier Reef. *Fems Microbiol Ecol* 73 (1), 43-54.
- Glover, W.B., **2014**. N-β-methylamino-L-alanine: A Non-Protein Amino Acid Incorporated into Protein, *Biochemistry and Molecular Biology*. THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA, p. 127.
- Glover, W.B., Liberto, C.M., McNeil, W.S., Banack, S.A., Shipley, P.R., Murch, S.J., **2012**. Reactivity of β-Methylamino-L-alanine in Complex Sample Matrixes Complicating Detection and Quantification by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 84 (18), 7946-7953.
- Glover, W.B., Mash, D.C., Murch, S.J., **2014**. The natural non-protein amino acid N-beta-methylamino-L-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis. *Amino Acids* 46 (11), 2553-2559.
- Glover, W.B., Murch, S.J., **2014**. Analysis of β-Methylamino-Alanine in Environmental and Food Samples, in: Jetter, R. (Ed.), *Phytochemicals – Biosynthesis, Function and Application*. Springer International Publishing, pp. 149-174.
- Gómez, F., **2012**. A checklist and classification of living dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *CICIMAR Océanides* 27 67-143.
- Goto, J.J., Koenig, J.H., Ikeda, K., **2012**. The physiological effect of ingested β-N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 156 (3–4), 171-177.
- Graneli, E., Turner, J.T., **2006**. Ecology of harmful algae. Springer, The Netherlands.
- Grossart, H.P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., Brinkhoff, T., **2005**. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology* 7 (6), 860-873.
- Grossel, H., **2006**. Manuel d'observation et de dénombrement du phytoplancton marin. Document de méthode REPHY. Ifremer, Nantes.
- Groth, I., Schumann, P., Weiss, N., Martin, K., Rainey, F.A., **1996**. *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *International journal of systematic bacteriology* 46 (1), 234-239.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.-C., Humbert, J.-F., Guette, C., Bernard, C., **2005**. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45 (7), 919-928.
- Guillard, R.L., **1975**. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: Smith, W., Chanley, M. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US, New York, pp. 29-60.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., **1993**. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32 (3), 234-236.
- Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I.M., Camean, A.M., **2013**. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol* 53 139-152.
- Guzmán-Guillén, R., Moreno, I., Prieto Ortega, A.I., Eugenia Soria-Díaz, M., Vasconcelos, V., Cameán, A.M., **2015**. CYN determination in tissues from freshwater fish by LC–MS/MS: Validation and application in tissues from subchronically exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Talanta* 131 (0), 452-459.
- Guzman-Guillen, R., Ortega, A.I.P., Moreno, I., Gonzalez, G., Soria-Diaz, M.E., Vasconcelos, V., Camean, A.M., **2012**. Development and optimization of a method for the determination of Cylindrospermopsin from strains of *Aphanizomenon* cultures: Intra-laboratory assessment of its accuracy by using validation standards. *Talanta* 100 356-363.
- Halinen, K., Jokela, J., Fewer, D.P., Wahsten, M., Sivonen, K., **2007**. Direct evidence for production of microcystins by anabaena strains from the Baltic sea. *Appl Environ Microb* 73 (20), 6543-6550.

- Hallegraeff, G.M., **1993**. A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase. *Phycologia* 32 (2), 79-99.
- Hanrieder, J., Gerber, L., Persson Sandelius, Å., Brittebo, E.B., Ewing, A.G., Karlsson, O., **2014**. High Resolution Metabolite Imaging in the Hippocampus Following Neonatal Exposure to the Environmental Toxin BMAA Using ToF-SIMS. *ACS Chemical Neuroscience* 5 (7), 568-575.
- Harada, K.-I., Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M., Kondo, F., **1996**. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* 34 (6), 701-710.
- Harada, K., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., **1988**. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 448 (2), 275-283.
- Harrison, P.J., Waters, R.E., Taylor, F.J.R., **1980**. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16 (1), 28-35.
- Havens, K.E., **2008**. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems, in: Hudnell, H.K. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer New York, pp. 733-747.
- Hawkins, A.J.S., Salkeld, P.N., Bayne, B.L., Gnaiger, E., Lowe, D.M., **1985a**. Feeding and Resource-Allocation in the Mussel *Mytilus-Edulis* - Evidence for Time-Averaged Optimization. *Mar Ecol Prog Ser* 20 (3), 273-287.
- Hawkins, A.J.S., Smith, R.F.M., Bougrier, S., Bayne, B.L., Heral, M., **1997**. Manipulation of dietary conditions for maximal growth in mussels, *Mytilus edulis*, from the Marennes-Oleron Bay, France. *Aquatic Living Resources* 10 (1), 13-22.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R., **1985b**. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water-supply reservoir. *Appl Environ Microb* 50 (5), 1292-1295.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., **2008**. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8 (1), 3-13.
- Herbert, R.A., **1999**. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *Fems Microbiol Rev* 23 (5), 563-590.
- Hernandez-Farinas, T., Soudant, D., Barille, L., Belin, C., Lefebvre, A., Bacher, C., **2014**. Temporal changes in the phytoplankton community along the French coast of the eastern English Channel and the southern Bight of the North Sea. *Ices J Mar Sci* 71 (4), 821-833.
- Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., **2013**. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon* 75 16-26.
- Heussner, A.H., Mazija, L., Fastner, J., Dietrich, D.R., **2012**. Toxin content and cytotoxicity of algal dietary supplements. *Toxicology and Applied Pharmacology* 265 (2), 263-271.
- Hill, B.H., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R., Stevenson, R.J., McCormick, F.H., Johnson, C.B., **2000**. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *Journal of the North American Benthological Society* 19 (1), 50-67.
- Hillebrand, H., Kahlert, M., Haglund, A.L., Berninger, U.G., Nagel, S., Wickham, S., **2002**. Control of microbenthic communities by grazing and nutrient supply. *Ecology* 83 (8), 2205-2219.
- Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., Luckas, B., **2007**. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 42 (9), 1238-1250.
- His, E., Cantin, C., **1995**. *Biologie et Physiologie des Coquillages*. Ifremer.
- Holland, A., Kinnear, S., **2013**. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Marine Drugs* 11 (7), 2239-2258.

- Huang, T., Jander, G., de Vos, M., **2011**. Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry* 72 (13), 1531-1537.
- Huguet, A., Hatton, A., Villot, R., Quenault, H., Blanchard, Y., Fessard, V., **2014**. Modulation of Chromatin Remodelling Induced by the Freshwater Cyanotoxin Cylindrospermopsin in Human Intestinal Caco-2 Cells. *PLoS ONE* 9 (6), e99121.
- Humbert, J.F., Bérard, A., Leboulanger, C., **2001**. Impact écologique des cyanobactéries des eaux douces et saumâtres., in: Frémy, J.M., Lassus, P. (Ed.), Toxines d'algues dans l'alimentation. Ifremer, Plouzané, France, pp. 89-108.
- Humpage, A.R., Fontaine, F., Froschio, S., Burcham, P., Falconer, I.R., **2005**. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 68 (9), 739-753.
- Hwang, D.F., Lu, Y.H., **2000**. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38 (11), 1491-1503.
- Hyde, E.G., Carmichael, W.W., **1991**. Anatoxin-a(s), a naturally-occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC-3.1.1.7). *Journal of Biochemical Toxicology* 6 (3), 195-201.
- Ibelings, B.W., Backer, L.C., Kardinaal, W.E.A., Chorus, I., **2014**. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae* 40 (0), 63-74.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., **2007**. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 150 (1), 177-192.
- Ifremer, **2012**. Le Phytoplancton dans les eaux littorales métropolitaines de 2007 à 2012. Ifremer, Quadrigé² : données phytoplancton des réseaux REPHY,SRN et RHLN. Observatoire National de la Mer et du Littoral.
- Ikai, H., Yamamoto, S., **1997**. Identification and analysis of a gene encoding L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase involved in the 1,3-diaminopropane production pathway in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 179 (16), 5118-5125.
- Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K., Tanaka, N., **2008**. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1184 (1-2), 474-503.
- ISO, **2005**. Water quality -- Determination of microcystins -- Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection, ISO 20179:2005, p. 17.
- Ito, E., Satake, M., Yasumoto, T., **2002**. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon* 40 (5), 551-556.
- Ito, S., Tsukada, K., **2002**. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *Journal of Chromatography A* 943 (1), 39-46.
- Jakubowska, N., Szeląg-Wasielewska, E., **2015**. Toxic Picoplanktonic Cyanobacteria—Review. *Marine Drugs* 13 (3), 1497-1518.
- James, K.J., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., Skulberg, O., Furey, A., **2005**. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Commun Mass Sp* 19 (9), 1167-1175.
- James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B., Skulberg, O.M., **1998**. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 798 (1-2), 147-157.
- Jandera, P., **2011**. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 692 (1-2), 1-25.
- Jauffrais, T., Marcaillou, C., Herrenknecht, C., Truquet, P., Séchet, V., Nicolau, E., Tillmann, U., Hess, P., **2012**. Azaspiracid accumulation, detoxification and biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*. *Toxicon* 60 (4), 582-595.

- Jauffrais, T., Séchet, V., Herrenknecht, C., Truquet, P., Véronique, S., Tillmann, U., Hess, P., **2013**. Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate *Azadinium spinosum*. *Harmful Algae* 27 (0), 138-148.
- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H.K., Moon, H.B., Ra, J.S., Kim, S.D., **2010**. Bioaccumulation of Perfluorochemicals in Pacific Oyster under Different Salinity Gradients. *Environmental science & technology* 44 (7), 2695-2701.
- 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 (6), 1719-1730.
- Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L.L., Rasmussen, U., **2014a**. Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments. *PLoS One* 9 (1), e84578.
- Jiang, L., Ilag, L.L., **2014**. Detection of endogenous BMAA in dinoflagellate (*Heterocapsa triquetra*) hints at evolutionary conservation and environmental concern. *PubRaw Science*.
- Jiang, L., Johnston, E., Åberg, K.M., Nilsson, U., Ilag, L., **2013**. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 405 (4), 1283-1292.
- Jiang, L., Kiselova, N., Rosen, J., Ilag, L.L., **2014b**. Quantification of neurotoxin BMAA ([bgr]-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. *Sci. Rep.* 4.
- Jiang, W., Zhou, W., Uchida, H., Kikumori, M., Irie, K., Watanabe, R., Suzuki, T., Sakamoto, B., Kamio, M., Nagai, H., **2014c**. A New Lyngbyatoxin from the Hawaiian Cyanobacterium *Moorea producens*. *Marine Drugs* 12 (5), 2748.
- Jiao, Y., Chen, Q., Chen, X., Wang, X., Liao, X., Jiang, L., Wu, J., Yang, L., **2014**. Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin beta-methylamino-L-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk. *The Science of the total environment* 468 457-463.
- 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* 107 (20), 9252-9257.
- Kach, D., Ward, J.E., **2008**. The role of marine aggregates in the ingestion of picoplankton-size particles by suspension-feeding molluscs. *Mar Biol* 153 (5), 797-805.
- Kahru, M., Horstmann, U., Rud, O., **1994**. Satellite detection of increased cyanobacteria blooms in the Baltic Sea - natural fluctuation or ecosystem change. *Ambio* 23 (8), 469-472.
- Karamyan, V.T., Speth, R.C., **2008**. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sciences* 82 (5-6), 233-246.
- Karjalainen, M., Pääkkönen, J.-P., Peltonen, H., Sipilä, V., Valtonen, T., Viitasalo, M., **2008**. Nodularin concentrations in Baltic Sea zooplankton and fish during a cyanobacterial bloom. *Mar Biol* 155 (5), 483-491.
- Karlsson, K.M., Kankaanpää, H., Huttunen, M., Meriluoto, J., **2005a**. First observation of microcystin-LR in pelagic cyanobacterial blooms in the northern Baltic Sea. *Harmful Algae* 4 (1), 163-166.
- Karlsson, K.M., Spoof, L.E.M., Meriluoto, J.A.O., **2005b**. Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins and nodularin-R in animal tissue - Matrix effects and method validation. *Environmental Toxicology* 20 (3), 381-389.
- Karlsson, O., Berg, A.-L., Lindstrom, A.-K., Hanrieder, J., Arnerup, G., Roman, E., Bergquist, J., Lindquist, N.G., Brittebo, E.B., Andersson, M., **2012**. Neonatal Exposure to the Cyanobacterial Toxin BMAA Induces Changes in Protein Expression and Neurodegeneration in Adult Hippocampus. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130 (2), 391-404.
- Karlsson, O., Jiang, L., Andersson, M., Ilag, L.L., Brittebo, E.B., **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. *Toxicology letters* 226 (1), 1-5.

- Karlsson, O., Kultima, K., Wadensten, H., Nilsson, A., Roman, E., Andren, P.E., Brittebo, E.B., **2013**. Neurotoxin-Induced Neuropeptide Perturbations in Striatum of Neonatal Rats (vol 12, pg 1678, 2013). *J Proteome Res* 12 (5), 2321-2321.
- Karlsson, O., Lindquist, N.G., Brittebo, E.B., Roman, E., **2009a**. Selective Brain Uptake and Behavioral Effects of the Cyanobacterial Toxin BMAA (β -N-Methylamino-L-alanine) following Neonatal Administration to Rodents. *Toxicological Sciences* 109 (2), 286-295.
- Karlsson, O., Roman, E., Berg, A.-L., Brittebo, E.B., **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. *Behavioural Brain Research* 219 (2), 310-320.
- Karlsson, O., Roman, E., Brittebo, E.B., **2009b**. Long-term Cognitive Impairments in Adult Rats Treated Neonatally with β -N-Methylamino-L-Alanine. *Toxicological Sciences* 112 (1), 185-195.
- Kehr, J.C., Picchi, D.G., Dittmann, E., **2011**. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J Org Chem* 7 1622-1635.
- Keller, M.D., Selvin, R.C., Claus, W., Guillard, R.R.L., **1987**. Media for the Culture of Oceanic Ultraphytoplankton. *Journal of Phycology* 23 (4), 633-638.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., **2008**. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Appl Environ Microb* 74 (13), 4044-4053.
- Kerbrat, A.S., Amzil, Z., Pawlowicz, R., Golubic, S., Sibat, M., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., **2011**. First Evidence of Palytoxin and 42-Hydroxy-palytoxin in the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium*. *Marine Drugs* 9 (4), 543-560.
- Kiernan, M.C., Vucic, S., Cheah, B.C., Turner, M.R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J.R., Zoing, M.C., **2011**. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377 (9769), 942-955.
- Kinnear, S., **2010**. Cylindrospermopsin: A Decade of Progress on Bioaccumulation Research. *Marine Drugs* 8 (3), 542-564.
- Kisby, G.E., Roy, D.N., Spencer, P.S., **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. *Journal of Neuroscience Methods* 26 (1), 45-54.
- Kittler, K., Hoffmann, H., Lindemann, F., Koch, M., Rohn, S., Maul, R., **2014**. Biosynthesis of ^{15}N -labeled cylindrospermopsin and its application as internal standard in stable isotope dilution analysis. *Anal Bioanal Chem* 406 (24), 5765-5774.
- Kozlowsky-Suzuki, B., Wilson, A.E., Ferrao, A.D., **2012**. Biomagnification or biodilution of microcystins in aquatic foodwebs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harmful Algae* 18 47-55.
- Kreeger, D.A., Newell, R.I.E., **2001**. Seasonal utilization of different seston carbon sources by the ribbed mussel, *Geukensia demissa* (Dillwyn) in a mid-Atlantic salt marsh. *J Exp Mar Biol Ecol* 260 (1), 71-91.
- 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 (2-3), 547-557.
- Kruger, T., Oelmüller, R., Luckas, B., **2012**. The origin of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA): Cycads and/or cyanobacteria? *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 22 29-36.
- Kubo, T., Kato, N., Hosoya, K., Kaya, K., **2008**. Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon* 51 (7), 1264-1268.
- Kudela, R.M., **2011**. Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater. *Harmful Algae* 11 117-125.
- Kurland, L.T., Mulder, D.W., **1954**. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geo- graphic distribution, with special reference to the Mariana

- Islands, including clinical and pathological observations. Neurology (Minneapolis) 4 355-378,438-448.
- Lage, S., Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S., **2015a**. Biotransfer of β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) in a Eutrophicated Freshwater Lake. Marine Drugs 13 (3), 1185-1201.
- Lage, S., Burian, A., Rasmussen, U., Costa, P., Annadotter, H., Godhe, A., Rydberg, S., **2015b**. BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose? Environmental Science and Pollution Research 1-13.
- Lage, S., Costa, P.R., Moita, T., Eriksson, J., Rasmussen, U., Rydberg, S.J., **2014**. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. Aquatic Toxicology 152 (0), 131-138.
- Lajeunesse, A., Segura, P.A., Gelinas, M., Hudon, C., Thomas, K., Quilliam, M.A., Gagnon, C., **2012**. Detection and confirmation of saxitoxin analogues in freshwater benthic *Lyngbya wollei* algae collected in the St. Lawrence River (Canada) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1219 93-103.
- Lam-Hoai, T., Rougier, C., Lasserre, G., **1997**. Tintinnids and rotifers in a northern Mediterranean coastal lagoon. Structural diversity and function through biomass estimations. Mar Ecol Prog Ser 152 13-25.
- Lassus, P., Amzil, Z., Baron, R., Séchet, V., Barillé, L., Abadie, E., Bardouil, M., Sibat, M., Truquet, P., Bérard, J.-B., Gueguen, M., **2007**. Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. Aquatic Living Resources 20 (01), 59-67.
- Lassus, P., Bardouil, M., Baron, R., Garen, P., Laabir, M., Leguay, D., Masselin, P., Truquet, P., **2003**. Modélisation de la contamination des huîtres par les toxines d'*Alexandrium minutum*. Ifremer.
- Laurent, D., Kerbrat, A.S., Darius, H.T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M.P., Chinain, M., Molgo, J., Pauillac, S., **2008**. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? Harmful Algae 7 (6), 827-838.
- Lauringson, V., Kotta, J., Orav-Kotta, H., Kaljurand, K., **2014a**. Diet of mussels *Mytilus trossulus* and *Dreissena polymorpha* in a brackish nontidal environment. Marine Ecology 35 56-66.
- Lauringson, V., Kotta, J., Orav-Kotta, H., Kaljurand, K., **2014b**. Diet of mussels *Mytilus trossulus* and *Dreissena polymorpha* in a brackish nontidal environment. Marine Ecology-an Evolutionary Perspective 35 56-66.
- Lawton, L.A., Edwards, C., Beattie, K.A., Pleasance, S., Dear, G.J., Codd, G.A., **1995**. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. Nat Toxins 3 (1), 50-57.
- Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoen-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J., **2006**. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. Emerging Infectious Diseases 12 (6), 931-936.
- Ledreux, A., Thomazeau, S., Catherine, A., Duval, C., Yepremian, C., Marie, A., Bernard, C., **2010**. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. Harmful Algae 10 (1), 88-97.
- Lee, M., McGeer, P.L., **2012**. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. Neurobiology of Aging 33 (7), 1440-1447.
- Lefebvre, S., Marín Leal, J.C., Dubois, S., Orvain, F., Blin, J.-L., Bataillé, M.-P., Ourry, A., Galois, R., **2009**. Seasonal dynamics of trophic relationships among co-occurring suspension-feeders in two shellfish culture dominated ecosystems. Estuarine, Coastal and Shelf Science 82 (3), 415-425.
- Lehman, P.W., Boyer, G., Hall, C., Waller, S., Gehrts, K., **2005**. Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. Hydrobiologia 541 (1), 87-99.

- Lehman, P.W., Marr, K., Boyer, G.L., Acuna, S., Teh, S.J., **2013**. Long-term trends and causal factors associated with Microcystis abundance and toxicity in San Francisco Estuary and implications for climate change impacts. *Hydrobiologia* 718 (1), 141-158.
- Lehtimäki, J., Moisander, P., Sivonen, K., Kononen, K., **1997**. Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic sea cyanobacteria. *Appl Environ Microb* 63 (5), 1647-1656.
- Lemaire, N., Pellerin, J., Fournier, M., Girault, L., Tamigneaux, E., Cartier, S., Pelletier, E., **2006**. Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel mytilus spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture* 261 (2), 729-751.
- Li, A.F., Fan, H., Ma, F.F., McCarron, P., Thomas, K., Tang, X.H., Quilliam, M.A., **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. *Analyst* 137 (5), 1210-1219.
- Li, W., Xie, P., Chen, J., He, J., Guo, X., Yu, D., Chen, L., **2014**. Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. *Journal of Chromatography B* 963 (0), 113-118.
- Li, Z.Y., Chen, J.H., Li, X., Zhang, R.T., Chen, C., Shi, Q., Wang, S., Zheng, L., Wang, X.R., **2013**. Rapid Screening and Identification of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Red Tide Algae Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry with an Accurate-Mass Database. *Chinese J Anal Chem* 41 (7), 979-984.
- 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⁻. *Experimental Neurology* 217 (2), 429-433.
- Liu, Y., Chen, W., Li, D., Huang, Z., Shen, Y., Liu, Y., **2011**. Cyanobacteria/cyanotoxin-contaminations and eutrophication status before Wuxi Drinking Water Crisis in Lake Taihu, China. *Journal of Environmental Sciences* 23 (4), 575-581.
- Llewellyn, L.E., **2006**. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.* 23 (2), 200-222.
- Lobner, D., Piana, P.M.T., Salous, A.K., Peoples, R.W., **2007**. β -N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease* 25 (2), 360-366.
- Lopes-Lima, M., Lima, P., Hinzmann, M., Rocha, A., Machado, J., **2014**. Selective feeding by *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1771): The effects of seasonal changes and nutritional demands. *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* 44 (0), 18-22.
- Love, D.C., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D., **2010**. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercenaria mercenaria*) by depuration. *International Journal of Food Microbiology* 143 (3), 211-217.
- Lubet, P., **1959**. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés (mollusques bivalves).
- Lurling, M., Faassen, E.J., **2013**. Dog Poisonings Associated with a *Microcystis aeruginosa* Bloom in the Netherlands. *Toxins* 5 (3), 556-567.
- Lüring, M., Faassen, E.J., Van Eenennaam, J.S., **2011**. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research* 33 (2), 333-342.
- MacIntyre, H.L., Geider, R.J., Miller, D.C., **1996**. Microphytobenthos: The Ecological Role of the "Secret Garden" of Unvegetated, Shallow-Water Marine Habitats. I. Distribution, Abundance and Primary Production. *Estuaries* 19 (2), 186-201.
- Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G.A., **1990**. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A from both mammals and higher plants. *Febs Lett* 264 (2), 187-192.
- Mafra, L.L., Bricelj, V.M., Fennel, K., **2010**. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. *Aquatic Toxicology* 100 (1), 17-29.

- Magalhaes, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S., **2003**. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42 (3), 289-295.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., **1986**. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the fresh-water cyanobacterium *Anabaena-flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 24 (5), 425-434.
- Mann, D.G., Vanormelingen, P., **2013**. An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *The Journal of eukaryotic microbiology* 60 (4), 414-420.
- Marchetti, J., Bougaran, G., Le Dean, L., Megrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo, E., Baron, R., Robert, R., Cadoret, J.P., **2012**. Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis galbana* relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture* 326 106-115.
- Marín Leal, J.C., Dubois, S., Orvain, F., Galois, R., Blin, J.L., Ropert, M., Bataille, M.P., Ourry, A., Lefebvre, S., **2008**. Stable isotopes (δ C-13, δ N-15) and modelling as tools to estimate the trophic ecology of cultivated oysters in two contrasting environments. *Mar Biol* 153 (4), 673-688.
- Marler, T.E., Snyder, L.R., Shaw, C.A., **2010**. *Cycas micronesica* (Cycadales) plants devoid of endophytic cyanobacteria increase in beta-methylamino-L-alanine. *Toxicon* 56 (4), 563-568.
- Martin, C., Codd, G.A., Siegelman, H.W., Weckesser, J., **1989**. Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains. *Archives of Microbiology* 152 (1), 90-94.
- Martins, R., Fernandez, N., Beiras, R., Vasconcelos, V., **2007**. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine *Synechocystis* and *Synechococcus* cyanobacterial strains in marine invertebrates. *Toxicon* 50 (6), 791-799.
- Martins, R., Pereira, P., Welker, M., Fastner, J., Vasconcelos, V.M., **2005**. Toxicity of culturable cyanobacteria strains isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 46 (4), 454-464.
- Masseret, E., Banack, S., Boumédiène, F., Abadie, E., Brient, L., Pernet, F., Juntas-Morales, R., Pageot, N., Metcalf, J., Cox, P., Camu, W., the French Network on, A.L.S.C.D., Investigation, **2013**. Dietary BMAA Exposure in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Cluster from Southern France. *PLoS ONE* 8 (12), e83406.
- Masseret, E., Banack, S.A., Boumediene, F., Abadie, E., Brient, L., Vaquer, A., Morales, R., Pageot, N., Metcalf, J., Cox, P.A., Camu, W., **2011**. Detection of BMAA in the marine environment of a sporadic ALS cluster in southern France, 22nd international symposium on ALS/MND, Sydney.
- Matsunaga, H., Harada, K.I., Senma, M., Ito, Y., Yasuda, N., Ushida, S., Kimura, Y., **1999**. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: Sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Nat Toxins* 7 (2), 81-+.
- Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P., Carmichael, W.W., **1989**. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena-flos-aquae*. *J Am Chem Soc* 111 (20), 8021-8023.
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., **2003**. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75 (13), 3019-3030.
- Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Mejean, A., Ploux, O., **2010**. Biosynthesis of Cylindrospermopsin and 7-Epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp Strain PCC 6506: Identification of the *cyr* Gene Cluster and Toxin Analysis. *Appl Environ Microb* 76 (15), 4943-4949.
- Mazur-Marzec, H., Blaszczyk, A., Felczykowska, A., Hohlfeld, N., Kobos, J., Torunska-Sitarz, A., Devi, P., Montalvao, S., D'Souza, L., Tammela, P., Mikosik, A., Bloch, S., Nejman-Falencyk, B., Wegrzyn, G., **2015**. Baltic cyanobacteria - a source of biologically active compounds. *Eur J Phycol* 50 (3), 343-360.
- Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Plinski, M., Szafranek, J., **2006**. Characterization of nodularin variants in *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea using liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 20 (13), 2023-2032.

- Mazur-Marzec, H., Sutryk, K., Kobos, J., Hebel, A., Hohlfeld, N., Blaszczyk, A., Torunska, A., Kaczkowska, M.J., Lysiak-Pastuszek, E., Krasniewski, W., Jasser, I., **2013**. Occurrence of cyanobacteria and cyanotoxin in the Southern Baltic Proper. Filamentous cyanobacteria versus single-celled picocyanobacteria. *Hydrobiologia* 701 (1), 235-252.
- Mazur-Marzec, H., Tyminska, A., Szafraniek, J., Plinski, M., **2007**. Accumulation of nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Environmental Toxicology* 22 (1), 101-111.
- McCarron, P., Logan, A., Giddings, S., Quilliam, M., **2014**. Analysis of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in spirulina-containing supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Aquatic Biosystems* 10 (1), 5.
- McElhiney, J., Lawton, L.A., **2005**. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 219-230.
- McGorum, B.C., Pirie, R.S., Glendinning, L., McLachlan, G., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Cox, P.A., Codd, G.A., **2015**. Grazing livestock are exposed to terrestrial cyanobacteria. *Veterinary Research* 46.
- McGregor, G.B., Stewart, I., Sendall, B.C., Sadler, R., Reardon, K., Carter, S., Wruck, D., Wickramasinghe, W., **2012**. First Report of a Toxic Nodularia spumigena (Nostocales/Cyanobacteria) Bloom in Sub-Tropical Australia. I. Phycological and Public Health Investigations. *Int J Env Res Pub He* 9 (7), 2396-2411.
- Medhioub, W., Lassus, P., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Sechet, V., Sibat, M., Soudant, P., **2012**. Spirolide uptake and detoxification by Crassostrea gigas exposed to the toxic dinoflagellate Alexandrium ostenfeldii. *Aquaculture* 358 108-115.
- Méjean, A., Paci, G., Gautier, V., Ploux, O., **2014**. Biosynthesis of anatoxin-a and analogues (anatoxins) in cyanobacteria. *Toxicon* 91 (0), 15-22.
- Mejean, A., Peyraud-Thomas, C., Kerbrat, A.S., Golubic, S., Pauillac, S., Chinain, M., Laurent, D., **2010**. First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of Hydrocoleum lyngbyaceum (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon* 56 (5), 829-835.
- Mekebri, A., Blondina, G.J., Crane, D.B., **2009**. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (15), 3147-3155.
- Merel, S., Villarin, M.C., Chung, K., Snyder, S., **2013a**. Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins. *Toxicon* 76 118-131.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., **2013b**. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int* 59 (0), 303-327.
- Meriluoto, J., Codd, G.A., **2005**. TOXIC: cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis Åbo: Åbo Akademi University Press.
- Meriluoto, J., Karlsson, K., Spoof, L., **2004**. High-throughput screening of ten microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatographia* 59 (5-6), 291-298.
- Messineo, V., Bogianni, S., Melchiorre, S., Sechi, N., Luglie, A., Casiddu, P., Marlani, M.A., Padedda, B.M., Di Corcia, A., Mazza, R., Carloni, E., Bruno, M., **2009**. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 39 (2), 95-106.
- Messineo, V., Melchiorre, S., Di Corcia, A., Gallo, P., Bruno, M., **2010**. Seasonal succession of Cylindrospermopsis raciborskii and Aphanizomenon ovalisporum blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environ Toxicol* 25 (1), 18-27.
- Metcalf, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., Codd, G.A., **2008**. Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environmental Microbiology* 10 (3), 702-708.

- Metcalf, J.S., Banack, S.A., Richer, R., Cox, P.A., **2015**. Neurotoxic amino acids and their isomers in desert environments. *J Arid Environ* 112, Part B (0), 140-144.
- Metcalf, J.S., Codd, G.A., **2012**. Cyanotoxins, in: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, pp. 651-675.
- Miller, M.A., Kudela, R.M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S.C., Tinker, M.T., Staedler, M., Miller, W.A., Toy-Choutka, S., Dominik, C., Hardin, D., Langlois, G., Murray, M., Ward, K., Jessup, D.A., **2010**. Evidence for a Novel Marine Harmful Algal Bloom: Cyanotoxin (Microcystin) Transfer from Land to Sea Otters. *Plos One* 5 (9).
- Moffitt, M.C., Neilan, B.A., **2004**. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microb* 70 (11), 6353-6362.
- Mohamed, Z.A., Al-Shehri, A.M., **2015**. Biodiversity and toxin production of cyanobacteria in mangrove swamps in the Red Sea off the southern coast of Saudi Arabia. *Bot Mar* 58 (1), 23-34.
- Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A., **2003**. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environmental Toxicology* 18 (2), 137-141.
- Moisander, P.H., Lehman, P.W., Ochiai, M., Corum, S., **2009**. Diversity of *Microcystis aeruginosa* in the Klamath River and San Francisco Bay delta, California, USA. *Aquat Microb Ecol* 57 (1), 19-31.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., **2005**. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4 (4), 743-753.
- Mondo, K., Broc Glover, W., Murch, S.J., Liu, G., Cai, Y., Davis, D.A., Mash, D.C., **2014**. Environmental neurotoxins beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 70 26-32.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S.A., Mash, D.C., **2012**. Cyanobacterial Neurotoxin β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) in Shark Fins. *Marine Drugs* 10 (2), 509-520.
- Montine, T.J., Li, K., Perl, D.P., Galasko, D., **2005**. Lack of β -methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorro with PDC *Neurology* 65 (5), 768-769.
- Moreira, C., Azevedo, J., Antunes, A., Vasconcelos, V., **2013**. Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. *J Appl Microbiol* 114 (3), 605-620.
- Mortillaro, J.M., Schaal, G., Grall, J., Nerot, C., Brind'Amour, A., Marchais, V., Perdriau, M., Le Bris, H., **2014**. Comparative study of isotopic trends in two coastal ecosystems of North Biscay: A multitrophic spatial gradient approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 136 (0), 149-156.
- Mulvenna, V., Dale, K., Priestly, B., Mueller, U., Humpage, A., Shaw, G., Allinson, G., Falconer, I., **2012**. Health Risk Assessment for Cyanobacterial Toxins in Seafood. *Int J Env Res Pub He* 9 (3), 807-820.
- Munoz-Saez, E., Garcia, E.D., Portero, R.M.A., Martinez, A., Alados, M.T.S., Miguel, B.G., **2015**. Analysis of beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) neurotoxicity in rat cerebellum. *Neurotoxicology* 48 192-205.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., **2004a**. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (33), 12228-12231.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W., **2004b**. Occurrence of beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurologica Scandinavica* 110 (4), 267-269.

- Myers, T.G., Nelson, S.D., **1990**. Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine - detection and quantification under physiological conditions by C-13 NMR. J Biol Chem 265 (18), 10193-10195.
- Nabout, J., da Silva Rocha, B., Carneiro, F., Sant'Anna, C., **2013**. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. Biodiversity and Conservation 22 (12), 2907-2918.
- Nagai, H., Yasumoto, T., Hokama, Y., **1996**. Aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin as the causative agents of a red alga Gracilaria coronopifolia poisoning in Hawaii. Toxicon 34 (7), 753-761.
- Narayana, S., Chitra, J., Tapase, S.R., Thamke, V., Karthick, P., Ramesh, C., Murthy, K.N., Ramasamy, M., Kodam, K.M., Mohanraju, R., **2014**. Toxicity studies of Trichodesmium erythraeum (Ehrenberg, 1830) bloom extracts, from Phoenix Bay, Port Blair, Andamans. Harmful Algae 40 (0), 34-39.
- Nayar, S., Goh, B.P.L., Chou, L.M., Reddy, S., **2003**. In situ microcosms to study the impact of heavy metals resuspended by dredging on periphyton in a tropical estuary. Aquatic Toxicology 64 (3), 293-306.
- Neffling, M.R., Lance, E., Meriluoto, J., **2010**. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Environ Pollut 158 (3), 948-952.
- Neffling, M.R., Spoof, L., Meriluoto, J., **2009**. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularins-Comparison of columns. Anal Chim Acta 653 (2), 234-241.
- Negri, A.P., Jones, G.J., **1995**. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium Anabaena circinalis by the freshwater mussel Alathyria condola. Toxicon 33 (5), 667-678.
- Nicholson, B.C., Burch, M.D., **2001**. Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines. *A report prepared for the National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia, and the Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment*.
- Nielsen, P., **1993**. Peptide nucleic acid (PNA): A model structure for the primordial genetic material? Origins Life Evol Biosphere 23 (5-6), 323-327.
- Norris, R.L.G., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Senogles, P., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Davis, B.C., Seawright, A.A., Moore, M.R., **2001**. Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from Cylindrospermopsis raciborskii. Environmental Toxicology 16 (5), 391-396.
- Oberholster, P.J., Myburgh, J.G., Govender, D., Bengis, R., Botha, A.-M., **2009**. Identification of toxigenic Microcystis strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (4), 1177-1182.
- Oehrle, S.A., Southwell, B., Westrick, J., **2010**. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Toxicon 55 (5), 965-972.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., **1992**. Cylindrospermopsin - a potent hepatotoxin from blue-green alga Cylindrospermopsis raciborskii J Am Chem Soc 114 (20), 7941-7942.
- Okello, W., Ostermaier, V., Portmann, C., Gademann, K., Kurmayer, R., **2010**. Spatial isolation favours the divergence in microcystin net production by Microcystis in Ugandan freshwater lakes. Water Research 44 (9), 2803-2814.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., Dietrich, D.R., **2013**. (L)-BMAA Induced ER Stress and Enhanced Caspase 12 Cleavage in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells at Low Nonexcitotoxic Concentrations. Toxicological Sciences 131 (1), 217-224.
- Oliver, R.L., Ganf, G.G., **2000**. Freshwater blooms, in: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), The ecology of cyanobacteria. The diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 149-194.

- Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T., Carmichael, W.W., **1997**. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Nat Toxins* 5 (4), 146-151.
- Orphanet, **2008**. La sclérose latérale amyotrophique. Encyclopédie Orphanet Grand Public. Avec la collaboration des professeurs Vincent Meininger, Jean Pouget et Claude Desnuelle., <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/ScleroseLateraleAmyotrophique-FRfrPub106.pdf>. Last accessed July 20, 2015.
- Orr, P.T., Jones, G.J., Douglas, G.B., **2004a**. Response of cultured *Microcystis aeruginosa* from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries. *Mar Freshwater Res* 55 (3), 277-283.
- Orr, P.T., Jones, G.J., Hamilton, G.R., **2004b**. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide—implications for compliance with the Australian drinking water guidelines. *Water Research* 38 (20), 4455-4461.
- Osborne, N.J.T., Webb, P.M., Shaw, G.R., **2001**. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 27 (5), 381-392.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., **2007**. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int* 33 (8), 1070-1089.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., **2008**. Uptake and depuration of anatoxin-a by the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) under laboratory conditions. *Chemosphere* 72 (9), 1235-1241.
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A., Mash, D.C., **2009**. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 120 (4), 216-225.
- Paerl, H.W., **2012**. Marine Plankton, in: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, pp. 127-153.
- Paerl, H.W., Fulton, R.S., 3rd, Moisander, P.H., Dyble, J., **2001**. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *TheScientificWorldJournal* 1 76-113.
- Paerl, H.W., Otten, T.G., **2013**. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol* 65 (4), 995-1010.
- Page, H.M., Lastra, M., **2003**. Diet of intertidal bivalves in the Ría de Arosa (NW Spain): evidence from stable C and N isotope analysis. *Mar Biol* 143 (3), 519-532.
- Papadimitriou, T., Kagalogou, I., Stalikas, C., Pilidis, G., Leonardos, I.D., **2012**. Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology* 21 (4), 1155-1166.
- Park, H.-D., Kim, B., Kim, E., Okino, T., **1998**. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes. *Environmental Toxicology and Water Quality* 13 (3), 225-234.
- Pascoe, P.L., Parry, H.E., Hawkins, A.J.S., **2009**. Observations on the measurement and interpretation of clearance rate variations in suspension-feeding bivalve shellfish. *Aquatic Biology* 6 (1-3), 181-190.
- Paul, C., Mausz, M.A., Pohnert, G., **2013**. A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. *Metabolomics* 9 (2), 349-359.
- Pawlik-Skowrońska, B., Kalinowska, R., Skowroński, T., **2013**. Cyanotoxin diversity and food web bioaccumulation in a reservoir with decreasing phosphorus concentrations and perennial cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 28 (0), 118-125.
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B., **2010**. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8 (5), 1650-1680.
- Peharda, M., Ezgeta-Balić, D., Davenport, J., Bojanić, N., Vidjak, O., Ninčević-Gladan, Ž., **2012**. Differential ingestion of zooplankton by four species of bivalves (Mollusca) in the Mali Ston Bay, Croatia. *Mar Biol* 159 (4), 881-895.

- Peperzak, L., Poelman, M., **2008**. Mass mussel mortality in The Netherlands after a bloom of *Phaeocystis globosa* (prymnesiophyceae). *Journal of Sea Research* 60 (3), 220-222.
- Pereira, P., Dias, E., Franca, S., Pereira, E., Carolino, M., Vasconcelos, V., **2004**. Accumulation and depuration of cyanobacterial paralytic shellfish toxins by the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology* 68 (4), 339-350.
- Pernet, F., Lagarde, F., Jeanne, N., Daigle, G., Barret, J., Le Gall, P., Quere, C., D'orbcastel, E.R., **2014**. Spatial and Temporal Dynamics of Mass Mortalities in Oysters Is Influenced by Energetic Reserves and Food Quality. *Plos One* 9 (2).
- Pernet, F., Malet, N., Pastoureaud, A., Vaquer, A., Quéré, C., Dubroca, L., **2012**. Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. *Journal of Sea Research* 68 (0), 20-32.
- Perry, T.L., Bergeron, C., Biro, A.J., Hansen, S., **1989**. β -N-Methylamino-L-alanine: Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *Journal of the Neurological Sciences* 94 (1-3), 173-180.
- Picoche, C., Le Gendre, R., Flye-Sainte-Marie, J., Françoise, S., Maheux, F., Simon, B., Gangnery, A., **2014**. Towards the Determination of *Mytilus edulis* Food Preferences Using the Dynamic Energy Budget (DEB) Theory. *PLoS ONE* 9 (10), e109796.
- Pires, L.M.D., Karlsson, K.M., Meriluoto, J.A.O., Kardinaal, E., Visser, P.M., Siewertsen, K., Donk, E.V., Ibelings, B.W., **2004**. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 69 (4), 385-396.
- Pitois, S., Jackson, M.H., Wood, B.J.B., **2001**. Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: An overview. *J Environ Health* 64 (5), 25-32.
- Plato, C.C., Garruto, R.M., Galasko, D., Craig, U.-K., Plato, M., Gamst, A., Torres, J.M., Wiederholt, W., **2003**. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinsonism-Dementia Complex of Guam: Changing Incidence Rates during the Past 60 Years. *Am J Epidemiol* 157 (2), 149-157.
- Poyer, S., Loutelier-Bourhis, C., Coadou, G., Mondegue, F., Enche, J., Bossee, A., Hess, P., Afonso, C., **2015**. Identification and separation of saxitoxins using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to traveling wave ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 50 (1), 175-181.
- Pradat, P.F., **2015**. Portail de la coordination des centres et des réseaux de prise en charge de la Sclérose Latérale Amyotrophique. <http://portail-sla.fr/sla/L1Menu/lamaladie/.3#maladie7>, <http://portail-sla.fr/sla/L1Menu/lamaladie/.3#maladie7>. Last accessed August, 2015.
- Preece, E.P., Moore, B.C., Hardy, F.J., Deobald, L.A., **2015**. First detection of microcystin in Puget Sound, Washington, mussels (*Mytilus trossulus*). *Lake and Reservoir Management* 31 (1), 50-54.
- Provasoli, L., **1968**. Media and prospects for the cultivation of marine algae, in: Watanabe, A., Hattori, A. (Eds.), *Cultures and Collections of Algae*. Japan Soc. Plant Physiol, Tokyo, Japan, pp. 63-75.
- Purdie, E.L., Samsudin, S., Eddy, F.B., Codd, G.A., **2009**. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 95 (4), 279-284.
- Qi, Y.L., Rosso, L., Sedan, D., Giannuzzi, L., Andrinolo, D., Volmer, D.A., **2015**. Seven new microcystin variants discovered from a native *Microcystis aeruginosa* strain - unambiguous assignment of product ions by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 29 (2), 220-224.
- Quesada, A., Moreno, E., Carrasco, D., Paniagua, T., Wormer, L., Hoyos, C.d., Sukenik, A., **2006**. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur J Phycol* 41 (1), 39-45.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T., Sivonen, K., **2004**. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2), 568-573.
- Rao, S.D., Banack, S.A., Cox, P.A., Weiss, J.H., **2006**. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Experimental Neurology* 201 (1), 244-252.

- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., Lahti, K., **2002**. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. Anal Chim Acta 466 (2), 213-231.
- Rapala, J., Lahti, K., Sivonen, K., Niemelä, S.I., **1994**. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. Letters in Applied Microbiology 19 (6), 423-428.
- Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K., Lahti, K., Hoppu, K., Lepisto, L., **2005**. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. Environmental Toxicology 20 (3), 331-340.
- Reed, W., Plato, C., Elizan, T., Kurland, L.T., **1966**. The amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex: A ten year follow up on Guam. Am. J. Epidem 83 54-73.
- Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R., Park, M.G., **2012**. Harmful Dinophysis species: A review. Harmful Algae 14 (0), 87-106.
- Rellan, S., Osswald, J., Saker, M., Gago-Martinez, A., Vasconcelos, V., **2009**. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. Food Chem Toxicol 47 (9), 2189-2195.
- Ren, J.S., Ross, A.H., Hayden, B.J., **2006**. Comparison of assimilation efficiency on diets of nine phytoplankton species of the greenshell mussel Perna canaliculus. J. Shellfish Res. 25 (3), 887-892.
- Réveillon, D., Abadie, E., Sechet, 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. Marine Drugs 12 (11), 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. Marine Environmental Research <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.1007.1015>.
- Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., **201X in prep**. Systematic detection of BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in nine bivalve production areas from the three French coasts (Channel, Atlantic and Mediterranean sites).
- Reynolds, C.S., **2006**. Phytoplankton, in: Usher, M., Saunders, D., Peet, R., Dobson, A. (Eds.), The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation). Cambridge University Press, pp. 1-36.
- Richardson, L.L., Sekar, R., Myers, J.L., Gantar, M., Voss, J.D., Kaczmarzsky, L., Remily, E.R., Boyer, G.L., Zimba, P.V., **2007**. The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. Fems Microbiol Lett 272 (2), 182-187.
- Riera, P., Richard, P., **1996**. Isotopic determination of food sources of Crassostrea gigas along a trophic gradient in the estuarine bay of Marennes-Oleron. Estuar Coast Shelf S 42 (3), 347-360.
- Rigolet, C., Thiebaut, E., Dubois, S.F., **2014**. Food web structures of subtidal benthic muddy habitats: evidence of microphytobenthos contribution supported by an engineer species. Mar Ecol Prog Ser 500 25-U49.
- Riisgard, H.U., Kittner, C., Seerup, D.F., **2003**. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (Cardium edule, Mytilus edulis, Mya arenaria) in response to low algal concentration. J Exp Mar Biol Ecol 284 (1-2), 105-127.
- Riisgard, H.U., Larsen, P.S., **2010**. Particle capture mechanisms in suspension-feeding invertebrates. Mar Ecol Prog Ser 418 255-293.
- Rinehart, K.L., Namikoshi, M., Choi, B.W., **1994**. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria). Journal of Applied Phycology 6 (2), 159-176.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., **1979**. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. Journal of general microbiology 111 (MAR), 1-61.
- Rivasseau, C., Martins, S., Hennion, M.C., **1998**. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. Journal of Chromatography A 799 (1-2), 155-169.
- Rivetti, C., Gómez-Canela, C., Lacorte, S., Barata, C., **2015**. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry to characterise trace levels of cyanobacteria and dinoflagellate toxins in suspended solids and sediments. Anal Bioanal Chem 407 (5), 1451-1462.
- Robinson, N.A., Matson, C.F., Pace, J.G., **1991**. Association of microcystin-LR and its biotransformation product with a hepatic-cytosolic protein. Journal of Biochemical Toxicology 6 (3), 171-180.
- Rodgers, K.J., **2014**. Non-protein amino acids and neurodegeneration: The enemy within. Experimental Neurology 253 (0), 192-196.
- Rodriguez, I., Alfonso, C., Alfonso, A., Otero, P., Meyer, T., Breitenbach, U., Botana, L.M., **2014**. Toxin profile in samples collected in fresh and brackish water in Germany. Toxicon 91 (0), 35-44.
- Romagnoli, T., Bavestrello, G., Cucchiari, E.M., De Stefano, M., Di Camillo, C.G., Pennesi, C., Puce, S., Totti, C., **2007**. Microalgal communities epibiotic on the marine hydroid Eudendrium racemosum in the Ligurian Sea during an annual cycle. Mar Biol 151 (2), 537-552.
- Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.C., Sood, S., LeGresley, M., Martin, J.L., **2005**. Links between Phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. Microb Ecol 49 (1), 163-175.
- 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 (12), 1785-1789.
- Roué, M., Cruchet, P., Ung, A., Darius, T., Chinain, M., Laurent, D., **2013**. Giant clams: New vectors of ciguatera? Toxicon 75 (0), 206.
- Rouillon, G., Navarro, E., **2003**. Differential utilization of species of phytoplankton by the mussel *Mytilus edulis*. Acta Oecologica 24, Supplement 1 (0), S299-S305.
- Rouillon, G., Rivas, J.G., Ochoa, N., Navarro, E., **2005**. Phytoplankton composition of the stomach contents of the mussel *Mytilus edulis* L. from two populations: Comparison with its food supply. J. Shellfish Res. 24 (1), 5-14.
- Roy-Lachapelle, A., Sollic, M., Sauve, S., **2015**. Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 407 (18), 5487-5501.
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., **2007**. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. Toxicon 50 (6), 800-809.
- Ruivo, M., Amorim, A., Cartaxana, P., **2011**. Effects of growth phase and irradiance on phytoplankton pigment ratios: implications for chemotaxonomy in coastal waters. Journal of Plankton Research 33 (7), 1012-1022.
- Ruiz, M., Galanti, L., Ruibal, A.L., Rodriguez, M.I., Wunderlin, D.A., Ame, M.V., **2013**. First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-occurrence in San Roque Reservoir (Cordoba, Argentina). Water Air Soil Poll 224 (6).
- Saito, M.A., Rocap, G., Moffett, J.W., **2005**. Production of cobalt binding ligands in a *Synechococcus* feature at the Costa Rica upwelling dome. Limnol Oceanogr 50 (1), 279-290.
- Saker, M.L., Eaglesham, G.K., **1999**. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Toxicon 37 (7), 1065-1077.
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Vasconcelos, V.M., **2004**. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Toxicon 43 (2), 185-194.

- Salomonsson, M.L., Hansson, A., Bondesson, U., **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. Anal Methods-Uk 5 (18), 4865-4874.
- Sanchez, J.A., Otero, P., Alfonso, A., Ramos, V., Vasconcelos, V., Araoz, R., Molgo, J., Vieytes, M.R., Botana, L.M., **2014**. Detection of Anatoxin-a and Three Analogs in *Anabaena* spp. Cultures: New Fluorescence Polarization Assay and Toxin Profile by LC-MS/MS. Toxins 6 (2), 402-415.
- Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., Kaya, K., **1992**. A Method for Micro-Determination of Total Microcystin Content in Waterblooms of Cyanobacteria (Blue-Green Algae). International Journal of Environmental Analytical Chemistry 49 (3), 163-170.
- Sano, T., Takagi, H., Nagano, K., Nishikawa, M., Kaya, K., **2011**. Accurate LC-MS analyses for microcystins using per-N-15-labeled microcystins. Anal Bioanal Chem 399 (7), 2511-2516.
- Scanlan, D.J., **2012**. Marine Picocyanobacteria, in: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, pp. 503-533.
- Schmidt, J., Wilhelm, S., Boyer, G., **2014**. The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring. Toxins 6 (12), 3354-3387.
- Schopf, J.W., **2012**. The Fossil Record of Cyanobacteria, in: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, pp. 15-36.
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Slobodnik, J., Ipolyi, I.M., Oswald, P., Krauss, M., Schulze, T., Haglund, P., Letzel, T., Grosse, S., Thomaidis, N.S., Bletsou, A., Zwiener, C., Ibanez, M., Portoles, T., de Boer, R., Reid, M.J., Onghena, M., Kunkel, U., Schulz, W., Guillon, A., Noyon, N., Leroy, G., Bados, P., Bogialli, S., Stipanicev, D., Rostkowski, P., Hollender, J., **2015**. Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. Anal Bioanal Chem.
- Scott, L.L., Downing, S., Phelan, R.R., Downing, T.G., **2014**. Environmental modulation of microcystin and beta-N-methylamino-L-alanine as a function of nitrogen availability. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 87 1-5.
- Scott, P.M., Niedzwadek, B., Rawn, D.F.K., Lau, B.P.Y., **2009**. Liquid Chromatographic Determination of the Cyanobacterial Toxin b-N-Methylamino-L-Alanine in Algae Food Supplements, Freshwater Fish, and Bottled Water. Journal of Food Protection 78 (8), 1769-1773.
- Serive, B., Kaas, R., Berard, J.-B., Pasquet, V., Picot, L., Cadoret, J.-P., **2012**. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. Bioresource Technology 124 311-320.
- Serrano, L., Reina, M., Arechederra, A., Casco, M.A., Toja, J., **2004**. Limnological description of the Tarelo lagoon (SW Spain). Limnetica 23 1-10.
- Shams, S., Capelli, C., Cerasino, L., Ballot, A., Dietrich, D.R., Sivonen, K., Salmaso, N., **2015**. Anatoxin-a producing *Tychonema* (Cyanobacteria) in European waterbodies. Water Research 69 68-79.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., Newell, R.C., Yentsch, C.M., **1985a**. Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. J Exp Mar Biol Ecol 91 (1-2), 77-92.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., Newell, R.C., Yentsch, C.M., **1985b**. Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. J Exp Mar Biol Ecol 91 (1-2), 77-92.
- Sidari, L., Nichetto, P., Cok, S., Sosa, S., Tubaro, A., Honsell, G., Della Loggia, R., **1998**. Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. Mar Biol 131 (1), 103-111.
- Sipia, V.O., Kankaanpää, H.T., Flinkman, J., Lahti, K., Meriluoto, J.A.O., **2001**. Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea. Environmental Toxicology 16 (4), 330-336.
- Sipiä, V.O., Kankaanpää, H.T., Pflugmacher, S., Flinkman, J., Furey, A., James, K.J., **2002**. Bioaccumulation and Detoxication of Nodularin in Tissues of Flounder (*Platichthys flesus*), Mussels (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*), and Clams (*Macoma balthica*) from the Northern Baltic Sea. Ecotoxicology and Environmental Safety 53 (2), 305-311.

- Sipiä, V.O., Neffling, M.-R., Metcalf, J.S., Nybom, S.M.K., Meriluoto, J.A.O., Codd, G.A., **2008**. Nodularin in feathers and liver of eiders (*Somateria mollissima*) caught from the western Gulf of Finland in June–September 2005. *Harmful Algae* 7 (1), 99-105.
- Sison-Mangus, M.P., Jiang, S., Tran, K.N., Kudela, R.M., **2014**. Host-specific adaptation governs the interaction of the marine diatom, *Pseudo-nitzschia* and their microbiota. *Isme J* 8 (1), 63-76.
- Sivonen, K., Jones, G., **1999**. Cyanobacterial toxins, In: Chorus & Bertram, J (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management*, E & FN Spon, London, pp. 41-111.
- Smaal, A.C., Twisk, F., **1997**. Filtration and absorption of *Phaeocystis* cf. *globosa* by the mussel *Mytilus edulis* L. *J Exp Mar Biol Ecol* 209 (1-2), 33-46.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V., **2008a**. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280 (1-4), 5-20.
- Smith, M.J., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Ho, L., Brookes, J.D., **2008b**. Elucidating the factors influencing the biodegradation of cylindrospermopsin in drinking water sources. *Environmental Toxicology* 23 (3), 413-421.
- Smith, V.H., **2003**. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (2), 126-139.
- Snyder, L.R., Cruz-Aguado, R., Sadilek, M., Galasko, D., Shaw, C.A., Montine, T.J., **2009**. Parkinson–dementia complex and development of a new stable isotope dilution assay for BMAA detection in tissue. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240 (2), 180-188.
- Snyder, L.R., Hoggard, J.C., Montine, T.J., Synovec, R.E., **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 (27), 4639-4647.
- Sotton, B., Guillard, J., Anneville, O., Marechal, M., Savichtcheva, O., Domaizon, I., **2014**. Trophic transfer of microcystins through the lake pelagic food web: Evidence for the role of zooplankton as a vector in fish contamination. *Sci Total Environ* 466 152-163.
- Spáčil, Z., Erkišson, J., Jonasson, S., Rasmussen, U., Ilag, L.L., Bergman, B., **2010**. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst* 135 127-132.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., **1987**. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237 (4814), 517-522.
- Spoof, L., Vestervik, P., Lindholm, T., Meriluoto, J., **2003**. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1020 (1), 105-119.
- Stafford, R.G., Mehta, M., Kempainen, B.W., **1992**. Comparison of the partition-coefficient and skin penetration of a marine algal toxin (lyngbyatoxin-A). *Food Chem Toxicol* 30 (9), 795-801.
- Stanic, D., Oehrle, S., Gantar, M., Richardson, L.L., **2011**. Microcystin production and ecological physiology of Caribbean black band disease cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 13 (4), 900-910.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., **1971**. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews* 35 (2), 171-205.
- Stefanelli, M., Vichi, S., Stipa, G., Funari, E., Testai, E., Scardala, S., Manganelli, M., **2014**. Survival, growth and toxicity of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 in experimental conditions mimicking some features of the human gastro-intestinal environment. *Chem-Biol Interact* 215 54-61.
- Stevens, D.K., Krieger, R.I., **1991**. Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid snatoxin-A. *Toxicon* 29 (2), 167-179.
- Stewart, I., Eaglesham, G.K., McGregor, G.B., Chong, R., Seawright, A.A., Wickramasinghe, W.A., Sadler, R., Hunt, L., Graham, G., **2012**. First Report of a Toxic *Nodularia spumigena*

- (Nostocales/Cyanobacteria) Bloom in Sub-Tropical Australia. II. Bioaccumulation of Nodularin in Isolated Populations of Mullet (Mugilidae). Int J Env Res Pub He 9 (7), 2412-2443.
- Stommel, E.W., Field, N.C., Caller, T.A., **2013**. Aerosolization of cyanobacteria as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. Medical hypotheses 80 (2), 142-145.
- Strogyloudi, E., Giannakourou, A., Legrand, C., Ruehl, A., Granéli, E., **2006**. Estimating the accumulation and transfer of Nodularia spumigena toxins by the blue mussel *Mytilus edulis*: An appraisal from culture and mesocosm experiments. Toxicon 48 (4), 359-372.
- Takahashi, T., Umehara, A., Tsutsumi, H., **2014**. Diffusion of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) from the reservoir of Isahaya Bay, Japan, into the marine and surrounding ecosystems as a result of large-scale drainage. Mar Pollut Bull 89 (1-2), 250-258.
- Taylor, M.S., Stahl-Timmins, W., Redshaw, C.H., Osborne, N.J., **2014**. Toxic alkaloids in *Lyngbya majuscula* and related tropical marine cyanobacteria. Harmful Algae 31 (0), 1-8.
- Teixera, M.G.L.C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S., Hage, E., **1993**. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. Bulletin of the Pan American Health Organization 27 244-253.
- Thessen, A.E., Bowers, H.A., Stoecker, D.K., **2009**. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. Harmful Algae 8 (5), 792-810.
- Thorel, M., Fauchot, J., Morelle, J., Raimbault, V., Le Roy, B., Miossec, C., Kientz-Bouchart, V., Claquin, P., **2014**. Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). Harmful Algae 39 232-241.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A., **2000**. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chemistry & Biology 7 (10), 753-764.
- Tompkins, J., DeVille, M.M., Day, J.G., Turner, M.F., **1995**. Culture Collection of Algae and Protozoa. Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, UK.
- Tonk, L., Bosch, K., Visser, P.M., Huisman, J., **2007**. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Aquat Microb Ecol 46 (2), 117-123.
- Torbick, N., Hession, S., Stommel, E., Caller, T., **2014**. Mapping amyotrophic lateral sclerosis lake risk factors across northern New England. International Journal of Health Geographics 13 (1), 1.
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G., **2012**. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. Harmful Algae 14 271-300.
- Trottet, A., Roy, S., Tamigneaux, E., Lovejoy, C., **2007**. Importance of heterotrophic planktonic communities in a mussel culture environment: the Grande Entrée lagoon, Magdalen Islands (Québec, Canada). Mar Biol 151 (1), 377-392.
- Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K., Codd, G.A., **1990**. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. BMJ : British Medical Journal 300 (6737), 1440-1441.
- Ueno, D., Isobe, T., Ramu, K., Tanabe, S., Alaei, M., Marvin, C., Inoue, K., Someya, T., Miyajima, T., Kodama, H., Nakata, H., **2010**. Spatial distribution of hexabromocyclododecanes (HBCDs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorines in bivalves from Japanese coastal waters. Chemosphere 78 (10), 1213-1219.
- Umehara, A., Komorita, T., Tai, A., Takahashi, T., Orita, R., Tsutsumi, H., **2015**. Short-term dynamics of cyanobacterial toxins (microcystins) following a discharge from a coastal reservoir in Isahaya Bay, Japan. Mar Pollut Bull 92 (1-2), 73-79.
- Utermöhl, H., **1958**. Zur Vervollkomnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. int. Ver. ther. angew. Limnol 9 1-38.
- van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., **2007**. Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition & Food Research 51 (1), 7-60.

- Van Buynder, P.G., Oughtred, T., Kirkby, B., Phillips, S., Eaglesham, G., Thomas, K., Burch, M., **2001**. Nodularin uptake by seafood during a cyanobacterial bloom. Environmental Toxicology 16 (6), 468-471.
- Van De Steene, J.C., Mortier, K.A., Lambert, W.E., **2006**. Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. Journal of Chromatography A 1123 (1), 71-81.
- Van Donk, E., Iannora, A., Vos, M., **2011**. Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: a review. Hydrobiologia 668 (1), 3-19.
- van Onselen, R., Cook, N.A., Phelan, R.R., Downing, T.G., **2015**. Bacteria do not incorporate beta-N-methylamino-L-alanine into their proteins. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 102 55-61.
- Vaquer, A., Troussellier, M., Courties, C., Bibent, B., **1996**. Standing stock and dynamics of picophytoplankton in the Thau Lagoon (northwest Mediterranean coast). Limnol Oceanogr 41 (8), 1821-1828.
- Vareli, K., Jaeger, W., Touka, A., Frillingos, S., Briasoulis, E., Sainis, I., **2013**. Hepatotoxic Seafood Poisoning (HSP) Due to Microcystins: A Threat from the Ocean? Marine Drugs 11 (8), 2751-2768.
- Vareli, K., Zarali, E., Zacharioudakis, G.S.A., Vagenas, G., Varelis, V., Pilidis, G., Briasoulis, E., Sainis, I., **2012**. Microcystin producing cyanobacterial communities in Amvrakikos Gulf (Mediterranean Sea, NW Greece) and toxin accumulation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Harmful Algae 15 109-118.
- Vasconcelos, V.M., **1995**. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 32 (2-3), 227-237.
- Vega, A., Bell, E.A., **1967**. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. Phytochemistry 6 (5), 759-762.
- Vichi, S., Lavorini, P., Funari, E., Scardala, S., Testai, E., **2012**. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. Food Chem Toxicol 50 (12), 4493-4499.
- Vieira, J.M.d.S., Azevedo, M.T.d.P., Azevedo, S.M.F.d.O., Honda, R.Y., Corrêa, B., **2005**. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. Toxicon 45 (7), 901-909.
- Viklund, C., Sjogren, A., Irgum, K., Nes, I., **2001**. Chromatographic interactions between proteins and sulfoalkylbetaine-based zwitterionic copolymers in fully aqueous low-salt buffers. Analytical Chemistry 73 (3), 444-452.
- Vilarino, N., Louzao, M.C., Fraga, M., Rodriguez, L.P., Botana, L.M., **2013**. Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain. Anal Bioanal Chem 405 (24), 7719-7732.
- Waajen, G.A.M., Faassen, E., Lüring, M., **2014**. Eutrophic urban ponds suffer from cyanobacterial blooms: Dutch examples. Environmental Science and Pollution Research 21 (16), 9983-9994.
- Walne, P.R., **1970**. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. H.M.S.O., London,.
- Walsh, C.T., Haynes, S.W., Ames, B.D., Gao, X., Tang, Y., **2013**. Short Pathways to Complexity Generation: Fungal Peptidyl Alkaloid Multicyclic Scaffolds from Anthranilate Building Blocks. Acs Chem Biol 8 (7), 1366-1382.
- Wang, J., Pang, X., Ge, F., Ma, Z., **2007**. An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China. Toxicon 49 (8), 1120-1128.
- Ward, C.J., Beattie, K.A., Lee, E.Y.C., Codd, G.A., **1997**. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-

- performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *Fems Microbiol Lett* 153 (2), 465-473.
- Weiss, J.H., Choi, D.W., **1988**. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 241 (4868), 973-975.
- Weiss, J.H., Christine, C.W., Choi, D.W., **1989**. Bicarbonate Dependence of Glutamate Receptor Activation by Beta-N-Methylamino-L-Alanine - Channel Recording and Study with Related-Compounds. *Neuron* 3 (3), 321-326.
- Welker, M., Bickel, H., Fastner, J., **2002**. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin - opportunities and limits. *Water Research* 36 (18), 4659-4663.
- Welker, M., von Dohren, H., **2006**. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *Fems Microbiol Rev* 30 (4), 530-563.
- Weller, M.G., **2013**. Immunoassays and Biosensors for the Detection of Cyanobacterial Toxins in Water. *Sensors-Basel* 13 (11), 15085-15112.
- Whiting, M., **1963a**. Toxicity of cycads. *Econ Bot* 17 (4), 270-302.
- Whiting, M., **1963b**. Toxicity of cycads: A literature review. *Econ. Bot* 17 270-302.
- Whitton, B.A., Potts, M., **2012**. Introduction to the Cyanobacteria, in: Whitton, B.A. (Ed.), Ecology of Cyanobacteria II. Springer Netherlands, pp. 1-13.
- WHO, **2003**. Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and fresh waters.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., **2005**. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 201-218.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A., **2010**. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs* 8 (7), 2185-2211.
- Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F.B., **1997**. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* 35 (11), 1617-1625.
- Wimmer, K.M., Strangman, W.K., Wright, J.L.C., **2014**. 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of Cylindrospermopsis raciborskii. *Harmful Algae* 37 203-206.
- Wong, W.H., Levinton, J.S., **2004**. Culture of the blue mussel Mytilus edulis (Linnaeus, 1758) fed both phytoplankton and zooplankton: a microcosm experiment. *Aquaculture Research* 35 (10), 965-969.
- Wood, S.A., Holland, P.T., MacKenzie, L., **2011**. Development of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for monitoring anatoxin-a and homoanatoxin-a in river water. *Chemosphere* 82 (6), 888-894.
- Wood, S.A., Holland, P.T., Stirling, D.J., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., **2006**. Survey of cyanotoxins in New Zealand water bodies between 2001 and 2004. *New Zeal J Mar Fresh* 40 (4), 585-597.
- Wörmer, L., Cirés, S., Agha, R., Verdugo, M., de Hoyos, C., Quesada, A., **2011**. First detection of cyanobacterial PSP (paralytic shellfish poisoning) toxins in Spanish freshwaters. *Toxicon* 57 (6), 918-921.
- Wormer, L., Cirés, S., Carrasco, D., Quesada, A., **2008**. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae* 7 (2), 206-213.
- Wormer, L., Huerta-Fontela, M., Cires, S., Carrasco, D., Quesada, A., **2010**. Natural Photodegradation of the Cyanobacterial Toxins Microcystin and Cylindrospermopsin. *Environmental science & technology* 44 (8), 3002-3007.
- Xie, L.Q., Yokoyama, A., Nakamura, K., Park, H., **2007**. Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail Sinotaia histrica and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon* 49 (5), 646-652.

- Xie, X.B., Basile, M., Mash, D.C., **2013**. Cerebral uptake and protein incorporation of cyanobacterial toxin beta-N-methylamino-L-alanine. Neuroreport 24 (14), 779-784.
- Yang, B., Xu, J.Z., Ding, T., Wu, B., Jing, S., Ding, S.J., Chen, H.L., Sheng, C.Y., Jiang, Y., **2009**. A novel method to detect seven microcystins in hard clam and corbicula fluminea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B 877 (29), 3522-3528.
- Yen, H.K., Lin, T.F., Liao, P.C., **2011**. Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. Toxicon 58 (2), 209-218.
- Yokoyama, A., Park, H.D., **2003**. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. Environmental Toxicology 18 (1), 61-67.
- Yoshida, T., **2004**. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 60 (3), 265-280.
- Zegura, B., Straser, A., Filipic, M., **2011**. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. Mutat Res-Rev Mutat 727 (1-2), 16-41.
- Zendong, Z., McCarron, P., Herrenknecht, C., Sibat, M., Amzil, Z., Cole, R.B., Hess, P., **in press**. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers. Journal of Chromatography A.
- Zhou, X., Escala, W., Papapetropoulos, S., Zhai, R.G., **2010**. β -N-Methylamino-L-Alanine Induces Neurological Deficits and Shortened Life Span in *Drosophila*. Toxins 2 (11), 2663-2679.
- Zimba, P.V., Camus, A., Allen, E.H., Burkholder, J.M., **2006**. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility. Aquaculture 261 (3), 1048-1055.

Annexes

Annexe 1 : Analyse bibliographique des cyanotoxines

1. Impacts environnementaux et sanitaires des blooms de cyanobactéries

Les blooms menacent l'intégrité des écosystèmes aquatiques ainsi que leurs usages. En effet, ils sont souvent accompagnés d'effets nocifs voire toxiques pour les animaux aquatiques mais également pour l'Homme (Paerl et al., 2001). La figure 43 représente les impacts négatifs qui peuvent découler de l'apparition ainsi que du déclin d'un bloom de microalgues, et plus particulièrement de cyanobactéries.

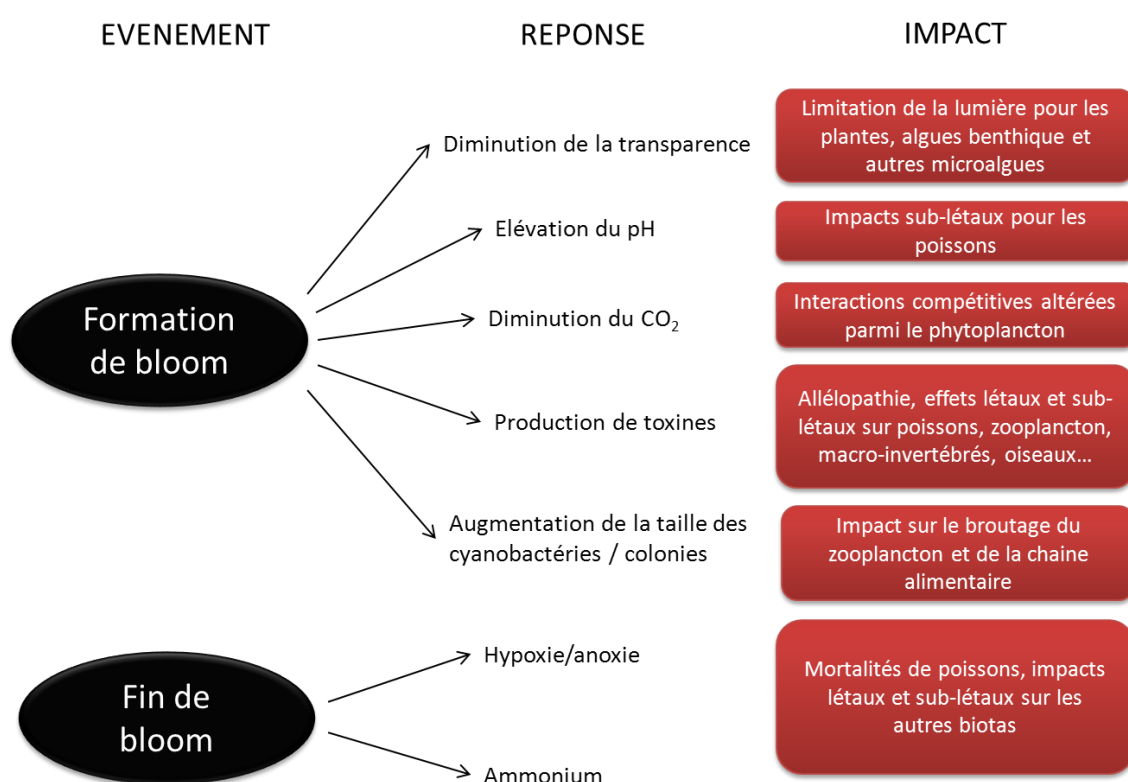


Figure 43 : schéma des effets nocifs possibles des blooms de cyanobactéries. Adapté de Havens (2008).

Les efflorescences sont donc sources d'impacts environnementaux et sanitaires. En effet, des impacts sur les organismes aquatiques (e.g. perturbation de la biodiversité, de l'équilibre et de la chaîne trophique de l'écosystème) voire des mortalités (e.g. de poissons par obstruction des branchies, intoxications, anoxies) ont été recensés (Matsunaga et al., 1999; Abrantes et al., 2006). De plus, il y a une modification de la qualité organoleptique du système affecté (e.g. odeur, coloration, décomposition de la prolifération) et de l'usage des plans d'eau (e.g. baignade, abreuvement du bétail, traitement de l'eau potable, exposition aux toxines des cyanobactéries) (Falconer, 1999; Carmichael, 2001; Smith et al., 2008a).

Les cyanobactéries toxiques peuvent former des blooms dont les effets nocifs sont exacerbés par la présence de toxines. A ce jour, différentes classes de cyanotoxines ont été répertoriées, en fonction de leur mode d'action. De nombreux organismes producteurs de ces centaines de métabolites secondaires bioactifs ont également été découverts.

2. Cyanotoxines

2.1 Différentes classes de cyanotoxines

Une cyanotoxine peut être considérée comme « un composé qui est produit par une cyanobactérie et qui a une activité biologique nocive dans un environnement donné ou un système donné » (Metcalf and Codd, 2012). Les toxines sont classées soit selon leur structure chimique (*i.e.* alcaloïdes ou peptides cycliques) soit, et plus généralement, en fonction de leur mode d'action (*i.e.* hépatotoxines, cytotoxines, neurotoxines et dermatotoxines dans une moindre mesure). La classification de la cylindrospermopsine est quant à elle ambiguë. Bien que longtemps incluse avec les hépatotoxines, il serait plus pertinent de la considérer comme une cytotoxine (Froscio et al., 2003).

De nombreux genres de cyanobactéries d'eau douce mais également retrouvés en estuaires et milieux marins produisent des cyanotoxines (e.g. *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Microcystis* et *Planktothrix*) (Codd et al., 2005).

La BMAA, qui est la toxine au centre de ce travail, sera traitée séparément des autres cyanotoxines communément admises. En effet, les travaux de cette thèse, corroborés par d'autres études, ont montré que la BMAA ne peut plus être considérée seulement en tant que cyanotoxine puisqu'elle est aussi produite par des espèces marines de dinoflagellés et diatomées.

2.1.1 Hépatotoxines : microcystines et nodularines

Les microcystines (MC) sont des heptapeptides cycliques présentant une structure similaire cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷) tandis que les nodularines (NOD) sont des pentapeptides cycliques avec une structure cyclo-(Mdha¹-D-MeAsp²-Z³-Adda⁴-D-glutamate⁵) (figure 44). Elles contiennent un acide aminé inhabituel, l'Adda (acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-méthoxy-2-6-8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-dièneïque) qui est relativement bien conservé et commun à environ 80 % des hépatotoxines (Fischer et al., 2001).

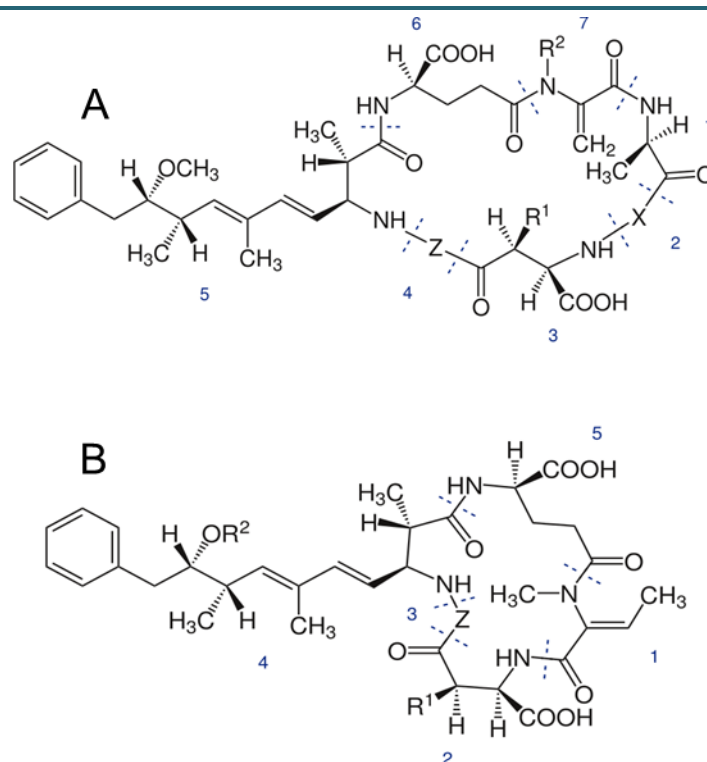


Figure 44 : structure générale de (A) la microcystine et (B) la nodularine

Les microcystines constituent le plus grand groupe de cyanotoxines et également le plus diversifié. A ce jour, plus de 100 analogues (*i.e.* composés dont la structure moléculaire varie mais apparentés à la même famille de toxines) ont été rapportés (Bortoli and Volmer, 2014) tandis que de nouveaux continuent d'être décrits (Qi et al., 2015). Bien que les variations de structure puissent se faire sur les sept acides aminés (Sivonen and Jones, 1999), elles sont plus fréquemment observées sur les résidus 2 et 4 (*i.e.* acides aminés variables, notés X et Z) qui donnent les deux lettres du suffixe (e.g. MC-LR qui possède une leucine, L, en position 2 et une arginine, R, en position 4). Des changements dans les autres résidus sont indiqués par un préfixe (e.g. [D-Asp³]MC-LR possède un acide aspartique en position 3 au lieu de la forme méthylée). L'annexe 3 montre la grande diversité de substitutions possibles pour les microcystines et nodularines.

Pour la nodularine, huit analogues seulement ont été observés chez *Nodularia spumigena* (Mazur-Marzec et al., 2006) et un analogue, appelé motuporin, a également été rapporté dans l'éponge *Thenella swinhoei*, qui possède néanmoins des cyanobactéries symbiotiques (Rinehart et al., 1994).

Les microcystines ont tout d'abord été isolées chez *Microcystis aeruginosa*, d'où leur nom (Carmichael et al., 1988). Depuis, de nombreuses autres espèces et genres ont été rapportés producteurs (e.g. *Microcystis*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Phormidium*) faisant de ces peptides cycliques les cyanotoxines les plus retrouvées dans les eaux douces et les plus étudiées

(Merel et al., 2013b). De la même façon, la nodularine a été nommée en fonction du premier organisme dans lequel elle a été retrouvée, *Nodularia spumigena* (Chorus and Bartram, 1999). Cependant, à l'inverse des microcystines et autres cyanotoxines, il semblerait que la production de nodularine soit restreinte à cette espèce filamenteuse (Metcalf and Codd, 2012) et donc aux eaux saumâtres où elle forme d'importantes efflorescences.

Au niveau moléculaire, les hépatotoxines sont des puissants inhibiteurs des protéines phosphatases sérine/thréonine PP1 et PP2A (Mackintosh et al., 1990). Une fois ingérées, elles sont véhiculées jusqu'au foie via le système de transport de la bile (*i.e.* transporteurs de la famille des OATP, organic anion transporting polypeptides) (Fischer et al., 2005). Un signe caractéristique d'intoxication aiguë aux hépatotoxines chez les mammifères est donc la destruction de la macrostructure du foie, qui provient de la déformation du cytosquelette des hépatocytes suite à une hyperphosphorylation des protéines (van Apeldoorn et al., 2007). Il peut en résulter la mort par choc hypovolémique⁸. La toxicité dépend des analogues mais également de la voie d'exposition (e.g. orale ou par injection intrapéritonéale, i.p.). Ainsi, la dose létale 50%⁹ (DL₅₀) chez la souris en i.p est de l'ordre de 50 – 1200 µg.kg⁻¹ alors qu'elle est 10 à 100 fois plus élevée par voie orale (Chorus and Bartram, 1999). Certains analogues non toxiques ont été identifiés, notamment ceux contenant le stéréoisomère de l'Adda (6 Z), suggérant que la conformation de ce fragment est nécessaire aux mécanismes toxiques des microcystines et nodularines (Rinehart et al., 1994). A ce jour, on ne peut plus seulement décrire ces molécules comme des hépatotoxines puisqu'elles peuvent s'accumuler dans d'autres organes [e.g. reins, poumons, intestins chez les mammifères, gonades, cœur et muscle chez les invertébrés aquatiques (Smith et al., 2008a)]. Elles pourraient également engendrer un stress oxydatif et auraient des effets génotoxiques et carcinogènes comme révélés par des intoxications chroniques en laboratoire et suggérés par des données épidémiologiques (Dittmann and Wiegand, 2006; Pearson et al., 2010; Zegura et al., 2011).

Les microcystines et nodularines sont relativement stables. Bien que globalement hydrophobes (log octanol/eau estimé entre 2,2 et 4 d'après Rivasseau et al. (1998)), elles sont considérées comme solubles dans l'eau d'où leur persistance dans l'environnement. En effet, lorsqu'elles se retrouvent libérées dans les milieux aquatiques (e.g. suite à la senescence des blooms), elles peuvent persister pendant des semaines (van Apeldoorn et al., 2007) avant d'être dégradées par des procédés abiotiques (*i.e.* photodégradation et adsorption aux matières en

⁸ Insuffisance circulatoire aiguë consécutive à une diminution rapide du volume sanguin circulant, la majorité du sang restant dans le foie

⁹ Dose de toxine qui tue 50 % des animaux exposés

suspension et aux sédiments) et biologiques (*i.e.* métabolisation et dégradation bactérienne) [revus par Dziga et al. (2013) et Schmidt et al., (2014)]. Globalement, leur dégradation peut être accélérée par les UV et les bactéries. Cependant, lorsqu'elles sont retrouvées en profondeur dans certains lacs, leur demi-vie peut-être supérieure à la durée d'apparition des cyanobactéries (Corbel et al., 2014).

2.1.2 Cytotoxines : cylindrospermopsine et analogues

La cylindrospermopsine (CYN) est un alcaloïde possédant une unité guanidine tricyclique et un hydroxyméthyle-uracile (respectivement A, B, C et D sur la figure 45).

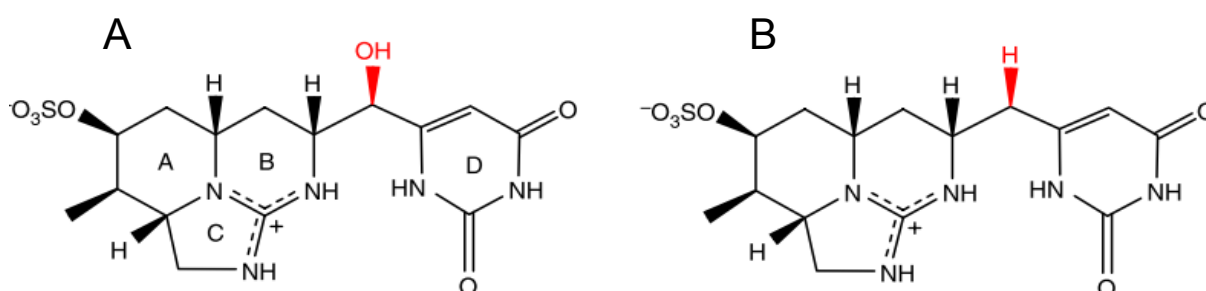


Figure 45 : structure de la (A) cylindrospermopsine et son analogue non toxique (B) la désoxycylindrospermopsine.

Seulement quatre autres analogues ont été rapportés, la désoxycylindrospermopsine (DoCYN), la 7-épicylindrospermopsine (Banker et al., 2000; Norris et al., 2001), et plus récemment la 7-deoxy-desulfo-cylindrospermopsine et la 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsine obtenues à partir d'une souche thaïlandaise de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wimmer et al., 2014).

Cylindrospermopsis raciborskii est d'ailleurs la première espèce à avoir été rapportée productrice de CYN, à la suite d'un épisode de gastro-entérite en Australie, lié à la présence de cette cyanobactérie dans une réserve d'eau locale (Hawkins et al., 1985b). Depuis, d'autres producteurs ont été identifiés comme *Umezakia natans*, *Aphanizomenon olivaceum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica* et *Lyngbya wollei* (Moreira et al., 2013).

La CYN est une cytotoxine qui bloque de façon irréversible la synthèse protéique (Frosio et al., 2003). La partie hydroxyméthyle-uracile de la molécule serait nécessaire à la toxicité (Banker et al., 2001), faisant de la DoCYN un analogue considéré non toxique. Ohtani et al. (1992) ont rapporté une DL_{50} par injection intrapéritonéale de $2100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ chez la souris. Les métabolites dérivés du

cytochrome P450¹⁰ seraient responsables de la cytotoxicité mais aussi de la génotoxicité de la cylindrospermopsine (Humpage et al., 2005). Bien que sa toxicité soit reconnue, son mécanisme d'action n'a pas été clairement élucidé à ce jour, comme expliqué dans Huguet et al. (2014).

La CYN est un composé stable à l'obscurité. Cependant, elle peut-être dégradée plus ou moins rapidement (*i.e.* 90 % en 2-3 jours vs. 27 % dégradés après 22 jours) à la lumière du soleil (Chiswell et al., 1999; Wormer et al., 2010). Smith et al. (2008b) ont également rapporté qu'une dégradation bactérienne était possible. La nature de zwitterion de la CYN en fait une molécule très soluble dans l'eau (Moreira et al., 2013). Contrairement à la plupart des toxines, une grande proportion de cylindrospermopsine (*i.e.* ≤ 90 %) se retrouve sous forme extracellulaire, dissoute dans l'eau, avant même la lyse des cellules (Norris et al., 2001; Rücker et al., 2007).

2.1.3 Neurotoxines

2.1.3.1 Anatoxine-a et analogues

L'anatoxine-a (ATX) est une amine secondaire bicyclique de faible poids moléculaire (*i.e.* 165 Da) (figure 46).

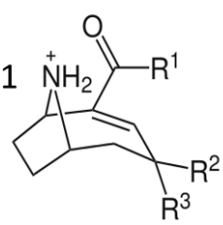
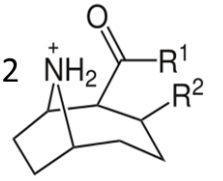
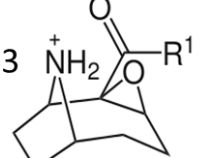
	Groupe	R ₁	R ₂	R ₃	Toxine
		CH ₃	H	H	Anatoxine-a (ATX)
		C ₂ H ₅	H	H	Homonanatoxine-a (HATX)
	1	C ₂ H ₅	OH	H	4S-hydro-HATX
		C ₂ H ₅	H	OH	4R-hydro-HATX
		C ₂ H ₅	H	H	Céto-HATX
		CH ₃	H		Dihydro-ATX
	2	C ₂ H ₅	H		Dihydro-HATX
		C ₂ H ₅	OCH ₃		Dihydrométhoxy-HATX
		CH ₃			Epoxy-ATX
	3	C ₂ H ₅			Epoxy-HATX

Figure 46 : structure de l'anatoxine-a (ATX) et ses analogues. Adapté de Hiller et al. (2007).

¹⁰ Enzyme impliquée dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme

Cet alcaloïde possède 10 analogues connus à ce jour (Hiller et al., 2007) dont le principal est l'homoanatoxine-a (HATX). Quant aux formes époxy et dihydro, elles pourraient être des produits de dégradation (James et al., 2005).

L'anatoxine-a a premièrement été rapportée chez *Anabaena flos aquae* (Devlin et al., 1977). Aujourd'hui, d'autres espèces et genres planctoniques en produiraient (e.g. *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Microcystis*, *Nostoc* et *Raphidiopsis*) (Osswald et al., 2007) ainsi qu'un genre benthique (i.e. *Phormidium*) (Gugger et al., 2005). Récemment, Shams et al. (2015) ont rapporté la production d'anatoxine-a par une nouvelle cyanobactérie, *Tychonema bourrellyi* isolée dans un lac en Italie.

Cette toxine est la première cyanotoxine à avoir été caractérisée structurellement et de façon pharmacologique. Son injection chez la souris entraînait la mortalité en quelques minutes seulement, c'est pourquoi on l'appelait Very Fast Death Factor (Carmichael et al., 1979). En tant que puissants agonistes de l'acétylcholine, les ATXs sont des inhibiteurs irréversibles des récepteurs nicotiniques de ce neurotransmetteur. Quand elles se lient aux récepteurs à la place de l'acétylcholine, ceux-ci sont sur-stimulés puisque l'acétylcholinestérase n'est pas capable d'hydrolyser les ATXs et donc de supprimer l'interaction. Les neurones continuent donc de propager des impulsions nerveuses entraînant une dépolarisation neuronale. Sans intervention et si la dose est suffisante, la paralysie causée par les ATXs entraîne la mort par arrêt respiratoire (Osswald et al., 2007). Une DL_{50} en i.p. de 200 - 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ est admise chez la souris pour l'ATX et l'HATX, avec une valeur 10 fois plus importante par voie orale (Chorus and Bartram, 1999; Osswald et al., 2007).

L'ATX et l'HATX sont des composés polaires très solubles dans l'eau. A cause de leur structure chimique, elles sont instables en conditions naturelles (Osswald et al., 2007) et partiellement voire totalement dégradées en analogues non toxiques dihydro et époxy, selon les conditions environnementales (James et al., 1998). Parmi les différents facteurs qui ont été étudiés, il semblerait que la lumière et le pH influencent le plus la dégradation (Stevens and Krieger, 1991), bien qu'une biodégradation soit également possible (Rapala et al., 1994). Finalement, l'ATX ne serait pas particulièrement persistante dans l'eau (i.e. demi-vie de quelques heures à quelques jours) (Osswald et al., 2007).

2.1.3.2 Anatoxine-a(s)

Une autre neurotoxine, qui n'est pas apparentée aux ATXs par sa structure, a été appelée anatoxine-a(s) en raison de la similarité de ses symptômes, le (s) faisant référence à l'excès de salivation induit (Mahmood and Carmichael, 1986). Ce composé inhabituel similaire aux pesticides organophosphorés, est un ester phosphate d'une *N*-hydroxyguanine cyclique (figure 47) qui inhibe l'acétylcholinestérase (Hyde and Carmichael, 1991).

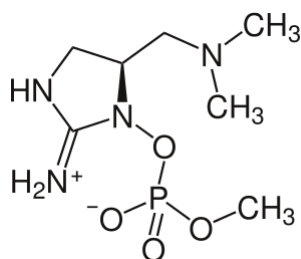


Figure 47 : structure de l'anatoxine-a(s)

L'anatoxine-a(s) n'a été rapportée que rarement. Elle serait produite par *Anabaena flos-aquae* et *Anabaena lemmermannii* (Metcalf and Codd, 2012). Aucun analogue n'a été identifié. Une DL_{50} de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en i.p. a été rapportée chez la souris (Chorus and Bartram, 1999), c'est donc une des plus puissantes cyanotoxines, avec la saxitoxine.

Elle est relativement stable en solutions neutre et acide, mais se dégrade rapidement en condition basique (Matsunaga et al., 1989).

2.1.3.3 Toxines paralysantes, saxitoxine et analogues

La saxitoxine (STX) et ses analogues, également appelés toxines paralysantes (PSTs, paralytic shellfish toxins) sont des alcaloïdes à noyau tétrahydropurique dont la structure générale est présentée sur la figure 48.

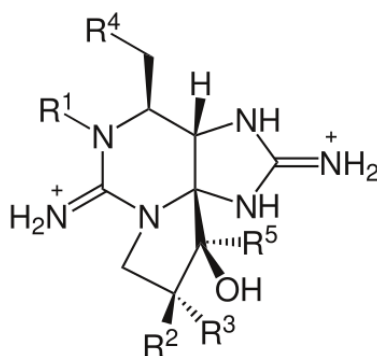


Figure 48 : structure générale de la saxitoxine et ses analogues.

Environ 57 analogues ont été rapportés dans des cyanobactéries (20 dont 7 spécifiques aux cyanobactéries), des dinoflagellés marins (38 dont 25 spécifiques aux dinoflagellés) et également des mollusques (5 métabolites identifiés) (Wiese et al., 2010). Ces neurotoxines peuvent être divisées en différents sous-groupes en fonction des substitutions de leurs chaînes latérales (e.g. carbamate, sulfate, hydroxyle, hydroxybenzoate, acétate). Par exemple, certains analogues sont non sulfatés (saxitoxine et néo-saxitoxine), d'autres mono-sulfatés comme les gonyautoxines (GTX) voire doublement sulfatés comme les C-toxines (voir annexe 4 pour plus d'informations sur les structures des PSTs produites par les cyanobactéries).

Une particularité des PSTs est donc qu'elles sont à la fois produites par des espèces de cyanobactéries en eau douce (e.g. genre *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* et *Lyngbya*) mais également par des dinoflagellés marins des genres *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium* (Wiese et al., 2010). Cependant, la production de lyngbyatoxines (LWTX) est restreinte à la cyanobactérie filamenteuse de laquelle elles tirent leur nom, *Lyngbya wollei* (Onodera et al., 1997). Les lyngbyatoxines 1 à 6, neurotoxines produites par *Lyngbya wollei* ne doivent pas être confondues avec les lyngbyatoxines A à C, dermatotoxines produites par *Lyngbya majuscula* (cf. paragraphe 2.1.4).

Les toxines paralysantes sont des inhibiteurs réversibles des canaux sodium voltage dépendant, qui agissent via l'interaction entre leurs unités guanidines chargées positivement et les groupes carboxyles des canaux chargés négativement (Cestele and Catterall, 2000). Il en résulte un blocage du pore des canaux et donc de la transmission nerveuse. Ceci se traduit, chez les mammifères, par une paralysie musculaire entraînant la mort par arrêt respiratoire. L'intoxication par les PSTs peut donner lieu à des symptômes neurologiques (e.g. picotement ou brûlure des lèvres, de la bouche et de la gorge) connus sous le nom de paralytic shellfish poisoning (PSP). Les différentes toxines paralysantes présentent une toxicité variable en fonction de leurs substitutions (Llewellyn, 2006). Ces molécules sont parmi les plus puissantes neurotoxines connues avec une DL_{50} de l'ordre de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en i.p. sur souris pour la saxitoxine et de l'ordre de $260 \mu\text{g.kg}^{-1}$ par voie orale (Chorus and Bartram, 1999). Les lyngbyatoxines semblent moins toxiques (i.e. 7 – 17 fois moins que les analogues carbamates) (Onodera et al., 1997).

Les PSTs subissent différentes conversions (i.e. hydrolyses ou biotransformations) qui peuvent donner lieu à la formation de composés moins toxiques, mais également de composés plus toxiques que les molécules de départ. C'est le cas des C-toxines qui, lorsqu'elles perdent leur groupe *N*-sulphocarbamate deviennent des dc-GTX, 10 à 100 fois plus toxiques (van Apeldoorn et al., 2007)

ou des LWTX qui peuvent se convertir en dcGTx2, dcGTx 3 et dcSTx (Foss et al., 2012). Un schéma de biotransformations des toxines paralysantes a été proposé par (Wiese et al., 2010), en annexe 5.

2.1.3.4 Autres neurotoxines

D'autres molécules produites par les cyanobactéries ont été rapportées en tant que neurotoxines par Araoz et al. (2010). Ces lipopeptides comme les antillatoxines (2 analogues), kalkitoxine et jamaïcarnides (3 analogues) ont tous été retrouvés chez *Lyngbya majuscula* (annexe 6).

2.1.4 Dermatotoxines et lipopolysaccharides

2.1.4.1 Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants de la membrane externe des bactéries gram-négatifs. A ce titre, ils correspondent à des endotoxines et sont communs à toutes les cyanobactéries (Martin et al., 1989). Les LPS sont constitués par une partie polysaccharide, la partie centrale, à laquelle sont associées une chaîne latérale polysidique (*i.e.* antigène O, spécifique à chaque bactérie) et une partie lipidique (*i.e.* lipide A) fortement hydrophobe et pyrogène qui conférerait la toxicité (Chorus and Bartram, 1999). Les LPS sont considérés comme peu toxiques, mais sont inclus dans la liste des cyanotoxines puisqu'ils sont présents chez toutes les cyanobactéries et qu'ils sont suspectés d'être à l'origine de problèmes de santé chez l'homme lors de l'exposition à des populations importantes de cyanobactéries (e.g. hypertension, réponses inflammatoires, troubles gastrointestinaux) (Metcalf and Codd, 2012). Wiegand and Pflugmacher (2005) rapportent également d'autres mécanismes de toxicité (e.g. perturbation des mécanismes de détoxification) sur les organismes aquatiques.

2.1.4.2 Les dermatotoxines

Les lyngbyatoxines (A à C), l'aplysiatoxine et la débromoaplysiatoxine sont respectivement des alcaloïdes indoles et deux phénols bilactones (figure 49) produits par *Lyngbya majuscula* (Taylor et al., 2014).

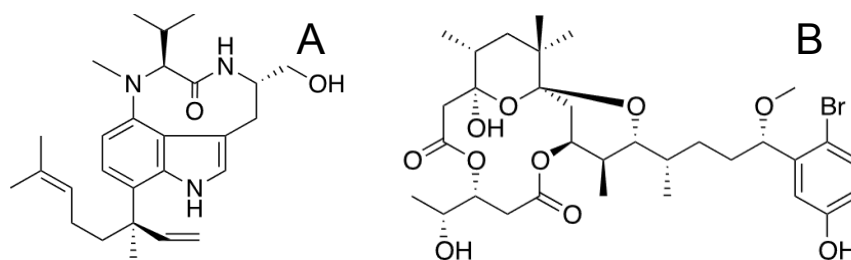


Figure 49 : structure de (A) la lyngbaytoxine A et (B) l'aplysiatoxine.

Cette cyanobactérie marine majoritairement retrouvée dans les eaux tropicales et subtropicales contiendrait plus de 70 composés présentant une activité biologique [voir la liste dans (Osborne et al., 2001)]. L'aplysiatoxine et son dérivé débromo ont également été observés dans l'algue rouge *Gracilaria coronopifolia*, sur laquelle la présence de cyanobactéries épiphytiques rendait compliquée l'identité exacte de l'organisme producteur (Nagai et al., 1996). Mais la détection de la débromoaplysiatoxine dans d'autres espèces de cyanobactéries (*i.e.* *Lyngbya gracilis* ainsi qu'un mélange *Oscillatoria nigroviridis/Schizothrix calcicola*) semble confirmer l'origine procaryote (Taylor et al., 2014). Récemment, deux nouveaux dérivés de la lyngbyatoxine A ont été rapportés dans *Lyngbya majuscula* (*i.e.* nommée *Moorea producens* maintenant) (Jiang et al., 2014c).

Ces toxines seraient responsables de cas de fortes irritations de baigneurs (e.g. inflammations cutanées érythémateuses suivies de boursouflures et de desquamations) dans l'océan pacifique (Cardellina et al., 1979). En laboratoire, il a été montré qu'environ 6 % de la dose de lyngbyatoxine A utilisée pouvait traverser la peau humaine (Stafford et al., 1992). Une DL_{50} de 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en i.p. chez la souris a été rapportée pour la lyngbyatoxine A (Ito et al., 2002). Ces dermatotoxines présenteraient également une activité de promotion tumorale (Fujiki et al., 1981).

Le tableau en annexe 7 résume les principales caractéristiques des différentes cyanotoxines.

2.2 Voies de biosynthèse

La plupart des métabolites secondaires des cyanobactéries, dont les cyanotoxines, sont produits par la voie de synthèse non ribosomale (Dittmann et al., 2013). Elle fait appel à des complexes enzymatiques multifonctionnels comprenant des NRPS (non ribosomal peptide synthetase), des PKS (polyketide synthase), des hybrides NRPS/PKS ou des transporteurs type ABC (Welker and von Dohren, 2006). Les peptides issus de ce mode de synthèse peuvent présenter des acides aminés non protéiques et atypiques comme le fragment Adda des hépatotoxines.

Les clusters des gènes de synthèse des cyanotoxines ont été identifiés pour la plupart des toxines [e.g. (Tillett et al., 2000; Moffitt and Neilan, 2004; Kellmann et al., 2008; Mazmouz et al., 2010; Méjean et al., 2014)]. La synthèse des cyanotoxines se fait donc en plusieurs étapes, requérant chacune des complexes enzymatiques différents, codés par de nombreux gènes (e.g. de 8 à 26 pour l'anatoxine-a et la saxitoxine, tableau 23).

Tableau 23 : gènes de biosynthèse des cyanotoxines ainsi que le numéro d'accèsion dans Genbank (Dittmann et al., 2013).

Toxine	Gènes de biosynthèse	Numéro d'accèsion dans Genbank (exemple d'espèce)
Microcystine	<i>mcyA-J</i>	AF183408 (<i>Microcystis</i> sp.) AJ441056 (<i>Plankothrix</i> sp.) AJ536156 (<i>Anabaena</i> sp.)
Nodularine	<i>ndaA-I</i>	AY210783 (<i>Nodularia spumigena</i>)
Cylindrospermopsine	<i>cyrA-O</i> / <i>aoaA-C</i>	EU140798 (<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>) AF395828 (<i>Anabaena olivasporum</i>) FJ418586 (<i>Umezakia natans</i>)
Anatoxine-a	<i>anaA-H</i>	FJ477836 (<i>Anabaena flos-aquae</i>)
Homoanatoxine-a		JF803645 (<i>Oscillatoria</i> sp.)
Saxitoxine	<i>sxtA-Z</i>	DQ787200 (<i>Anabaena circinalis</i>)
Lyngbyatoxine	<i>ltxA-D</i>	AY588942 (<i>Lyngbya majuscula</i> = <i>Moorea producens</i>)
Aplysiatoxine	Inconnu	- (<i>Lyngbya majuscula</i> = <i>Moorea producens</i>)

Les clusters de gènes présentent des différences notables en fonction des genres producteurs, probablement liés à l'évolution, et donc des degrés de similarité variables (Dittmann et al., 2013). La capacité de production des toxines et notamment des microcystines dans seulement certaines souches au sein d'une même espèce (*i.e.* non généralisée), résulterait de la perte des clusters de gènes codant pour la microcystine plutôt que de transferts horizontaux (Rantala et al., 2004).

Le développement d'outils moléculaires (*e.g.* sondes pour la PCR ou polymérase chain reaction qui s'hybrident sur les fragments cibles et permettent leur amplification spécifique) permet maintenant de déterminer si une souche donnée, en laboratoire ou présente dans l'environnement, a la capacité de produire une ou plusieurs cyanotoxines (Al-Tebrineh et al., 2010; Al-Tebrineh et al., 2012; Barón-Sola et al., 2012; Baker et al., 2013).

Récemment, il a été confirmé qu'une grande diversité de molécules bioactives pouvaient être produites par les cyanobactéries, en plus des toxines connues, via la voie de synthèse non ribosomale (Brito et al., 2015; Mazur-Marzec et al., 2015).

3. Analyse des cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des métabolites secondaires majoritairement intracellulaires. Retrouvées naturellement dans les microalgues qui les produisent, les cyanotoxines peuvent également être accumulées dans d'autres organismes (*cf.* annexe 1 paragraphe 4.2). Ainsi, l'analyse des cyanotoxines peut se faire à partir de différentes matrices. De nombreuses méthodes de détection ont été rapportées, mais nous nous focaliserons plus particulièrement sur les méthodes de chimie analytique et notamment les analyses multi-toxines.

3.1 Méthodes physico-chimiques

2.3.1 Extraction

Les cyanotoxines sont contenues dans les cyanobactéries (*i.e.* > 80% pour des cellules en bon état excepté pour la cylindrospermopsine) mais leur libération dans le milieu extracellulaire peut se faire lors de la senescence des blooms, ou lors d'un changement dans la phase de croissance (Meriluoto and Codd, 2005). En règle générale, l'extraction des cyanotoxines se fait à partir de matériel lyophilisé et la quantification est alors rapportée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec (ou dry weight, DW).

Pour extraire les toxines, les cyanobactéries (et autres microalgues) sont lysées par ultrasonication mais les performances d'extraction sont rarement évaluées (Barco et al., 2005). En raison de la difficulté à lyser les membranes des cyanobactéries, certaines équipes multiplient les étapes comme une congélation/décongélation dans l'azote liquide suivie d'une ou plusieurs étapes d'ultrasonication [e.g. (Rapala et al., 2002; Oehrle et al., 2010)]. A l'inverse, l'utilisation d'un broyage mécanique (e.g. avec des billes de verre) s'est avérée particulièrement efficace pour l'extraction de métabolites à partir de cyanobactéries (Devlin et al., 2013) et autres microalgues (Serive et al., 2012) avec de nombreux avantages sur la sonication (e.g. faible élévation de température possibilité d'extraire 20 échantillons simultanément) (Serive et al., 2012).

L'extraction des matrices plus complexes peut être faite à partir de chair fraîche avec des homogénéisateurs de type Polytron® (Cadel-Six et al., 2014) mais généralement, elle se fait à partir de matériel lyophilisé et par conséquent, les mêmes procédures d'extraction qu'avec les cyanobactéries sont applicables à différents types de matrices (e.g. Faassen et al. (2012b) ont extrait de la même façon des cyanobactéries, algues, foie, intestin et cerveau de chiens et oiseaux, tous lyophilisés).

Le solvant utilisé pour l'extraction des cyanotoxines doit permettre la solubilisation des molécules d'intérêt tout en limitant la co-extraction de composés interférents avec l'analyse (*i.e.* effets matrice). Des solvants organiques (e.g. méthanol pour les MCs) ou des solutions d'acides (e.g. acide acétique ou acide chlorhydrique pour les PSTs) ont été utilisés, en fonction de la polarité des toxines (van Apeldoorn et al., 2007). L'utilisation d'acide chlorhydrique peut entraîner la conversion de certains analogues de la saxitoxine et fausser les résultats, ce solvant n'est donc pas recommandé (Nicholson and Burch, 2001). Cependant, différentes familles de cyanotoxines peuvent théoriquement se retrouver dans un même échantillon. Dans ce cas, ou si on veut accélérer le processus de criblage (*i.e.* pas de connaissances *a priori* des composés potentiellement présents dans l'échantillon), il faut mettre en place des extractions universelles. Les cyanotoxines présentent une

large gamme de polarité et de structures, mais leur extraction simultanée avec une mixture composée de solvant organique (e.g. méthanol) et d'eau (Dahlmann et al., 2003) ou de solvant organique et d'acide (Hiller et al., 2007) constituent des compromis acceptables.

La plupart des cyanotoxines sont directement détectables après la lyse des cellules. Néanmoins, certaines microcystines peuvent former des liaisons covalentes avec les protéines phosphatases (Robinson et al., 1991). Cette proportion de MCs liée nécessite un traitement supplémentaire pour être quantifiable. L'oxydation par la technique de Lemieux (Sano et al., 1992) (figure 50) ou par ozonolyse (Harada et al., 1996) des MCs libèrent un fragment de l'acide aminé Adda, l'acide carboxylique MMPB (acide 2-méthyl-3-methoxy-4-phenylbutyrique). Ce marqueur unique est ensuite quantifié pour déterminer la concentration totale de microcystines (*i.e.* forme liée obtenue par différence) (Williams et al., 1997; Neffling et al., 2010; Cadel-Six et al., 2014). La partie libre des MCs peut largement sous-estimer la concentration totale dans un organisme, comme rapporté par Williams et al. (1997) chez *Mytilus galloprovincialis* (*i.e.* $\leq 1\%$ des MCs totales). Néanmoins, cette extraction est laborieuse et les rendements obtenus, notamment avec des matrices complexes (e.g. gastéropode ou poisson), limitent parfois son utilisation. De plus, elle ne permet pas d'identifier les analogues présents.

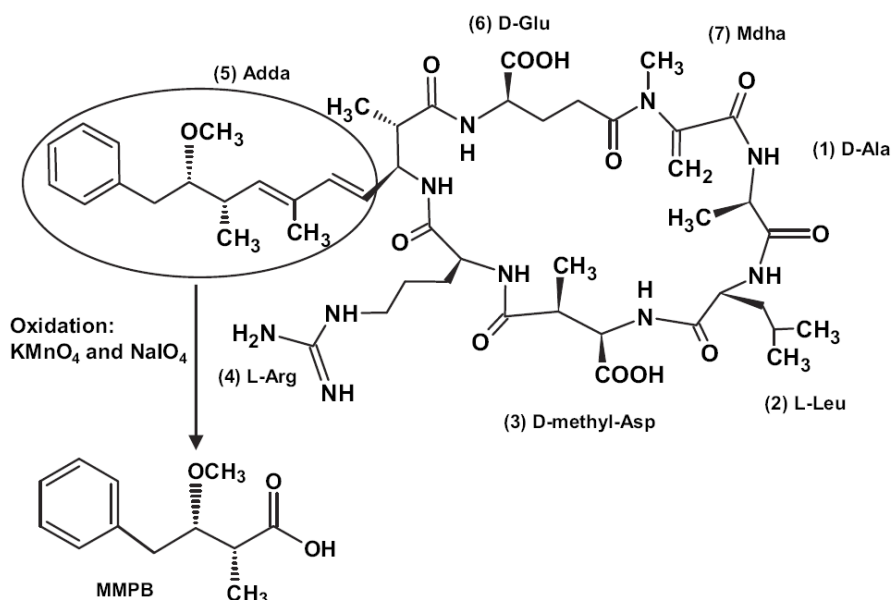


Figure 50 : l'oxydation de l'acide aminé atypique Adda (ici à partir de la MC-LR) entraîne la formation de l'acide carboxylique MMPB (Neffling et al., 2010).

3.1.2 Purification/concentration

Après l'extraction, il peut s'avérer nécessaire de concentrer les molécules d'intérêt pour les rendre détectables tout en « purifiant » les matrices. En effet, lors de la détection des cyanotoxines par spectrométrie de masse, les phénomènes de suppression ou d'augmentation de signal liés à des composants de la matrice co-extraits et qui interfèrent avec l'analyse sont fréquents (Matuszewski et al., 2003; Lajeunesse et al., 2012).

L'utilisation d'une SPE (solid phase extraction) peut permettre de réduire considérablement les limites de détection tout en améliorant les performances chromatographiques et en protégeant davantage le système analytique (Karlsson et al., 2005b). Cette technique est développée au chapitre 1 paragraphe 2.8.1.2 pour l'analyse de la BMAA et en annexe 8 pour les cyanotoxines.

3.1.3 Analyse en chromatographie

Des méthodes fiables, sélectives et sensibles sont nécessaires pour détecter et quantifier de façon précise les cyanotoxines dans l'environnement et les échantillons biologiques.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) et ses analogues ou avancées technologiques [e.g. HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) ou UPLC (ultra performance liquid chromatography)] sont les méthodes physico-chimiques les plus utilisées (figure 51), de par leur polyvalence, pour séparer les cyanotoxines (Nicholson and Burch, 2001; Dell'Aversano et al., 2004; van Apeldoorn et al., 2007; Neffling et al., 2009). La chromatographie en phase gazeuse a également été employée [e.g. pour l'anatoxine-a mais après dérivation pour rendre la molécule volatile (Bumke-Vogt et al., 1999)]. Elles peuvent-être couplées à différents détecteurs pour identifier et quantifier les principales classes de toxines connues à ce jour (e.g. détecteurs UV, de fluorescence (FLD), spectrométrie de masse (SM)).

Les hépatotoxines (*i.e.* MC et NOD), la CYN, l'ATX et leurs analogues peuvent être détectés par détecteurs UV type PDA (Photodiode array) et identifiés selon leur temps de rétention et leur spectre UV qui leur est caractéristique (van Apeldoorn et al., 2007). En effet, ces toxines ont différents chromophores qui absorbent entre 220 et 240 nm pour les MCs et NODs (*i.e.* maximum à 238 nm pour le diène conjugué sur le groupement Adda), 227 nm pour l'ATX et 262 pour la CYN (Meriluoto and Codd, 2005). La détection des microcystines par UV a même été normalisée ISO 20179:2005 (ISO, 2005). Les composés résiduels issus des matériaux plastiques peuvent cependant interférer avec la détection UV (Nicholson and Burch, 2001) tout comme des composés naturels, comme rapporté pour la CYN (Welker et al., 2002).

Mais toutes les cyanotoxines ne possèdent pas de chromophores. Elles peuvent malgré tout être dérivées pour donner des produits fluorescents détectés par FLD, comme les PSTs pour lesquelles deux méthodes sont admises, avec une dérivation pré- ou post-colonne (DeGrasse et al., 2011). La dérivation peut aussi être employée sur des toxines dont la détection UV est possible comme l'anatoxine-a et ses analogues. Ainsi, l'utilisation de 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) comme agent de dérivation a permis d'améliorer la sélectivité et la sensibilité d'analyse par FLD, par rapport à la détection UV (James et al., 1998; van Apeldoorn et al., 2007).

La spectrométrie de masse (SM) est l'analyseur privilégié pour l'analyse des cyanotoxines grâce à sa sensibilité et sa sélectivité. Contrairement aux autres méthodes analytiques, elle nécessite l'ionisation des molécules (figure 51).

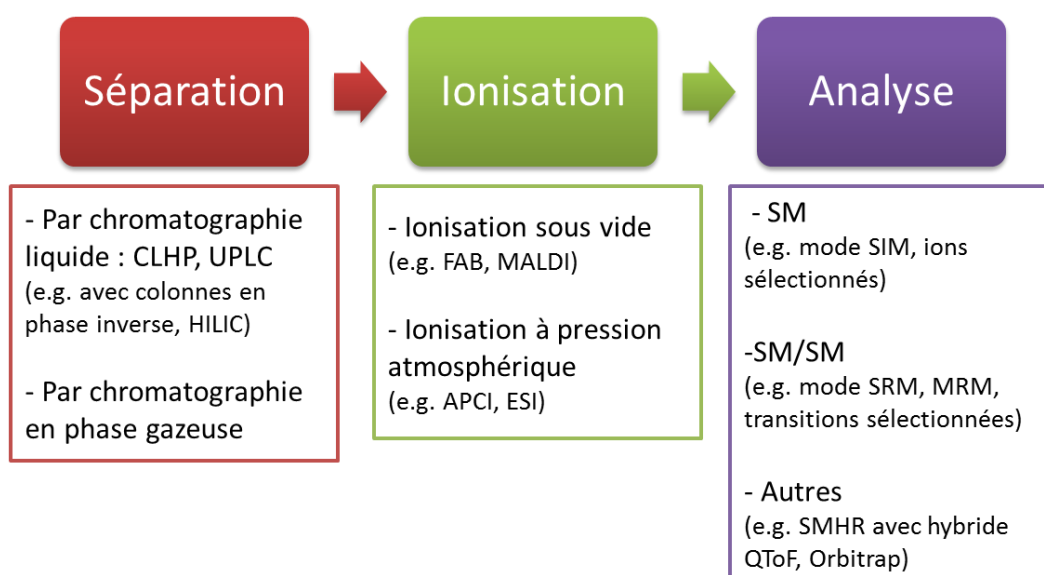


Figure 51 : principales méthodes et configuration pour l'analyse des cyanotoxines en utilisant la spectrométrie de masse.

Pour cela, plusieurs configurations ont été utilisées dans la détection des cyanotoxines (e.g. par bombardement d'atomes (FAB), désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) ou l'ionisation par électroébulisisation [ESI (Electrospray Ionization)] (McElhiney and Lawton, 2005). Une fois ionisées, les molécules sont soumises, sous vide, à des champs électriques et/ou magnétiques et ainsi séparées selon le rapport masse sur charge (m/z). L'analyse par spectrométrie de masse apporte donc un degré de confiance supplémentaire à l'identification des molécules par rapport à la détection par FLD (*i.e.* temps de rétention et masse moléculaire vs. temps de rétention seulement). Mais c'est la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) qui est la plus sélective et qui fournit l'identification la plus sûre avec quatre critères (*i.e.* en considérant l'association avec la CL) : le temps

de rétention, l'ion moléculaire ainsi que la possibilité de rechercher des transitions spécifiques liées à la fragmentation des molécules et l'évaluation des ratios d'ions (Metcalf and Codd, 2012). L'utilisation de la SM/SM a notamment permis l'amélioration de la détection de l'anatoxine-a qui pouvait auparavant être faussée par la présence de la phénylalanine dans de nombreux échantillons biologiques (*i.e.* l'acide aminé est une molécule isobarique) (Furey et al., 2005).

D'abord jugée trop couteuse, l'accès à la spectrométrie de masse s'est généralisé et des méthodes CL-SM et CL-SM/SM ont été développées pour toutes les classes de cyanotoxines [e.g. (Lawton et al., 1995; Meriluoto et al., 2004; Dell'Aversano et al., 2005; Bogialli et al., 2006; Fastner et al., 2007; Doerr et al., 2010; Poyer et al., 2015)]. Bien que ces méthodes aient prouvé leur utilité, elles ne permettent la détection que d'une seule classe de toxines, dans la majorité des cas (e.g. une méthode pour les microcystines, une autre pour l'anatoxine-a et ses analogues).

A l'inverse, des méthodes d'analyse multi-toxines ont été développées ces dernières années (tableau 24). Il est ainsi possible d'analyser plusieurs classes de cyanotoxines simultanément. La rétention des molécules les plus polaires (e.g. CYN) peut s'avérer difficile sur les colonnes en phase inverse classiquement utilisées (tableau 24). Une alternative consiste à utiliser la différence de sélectivité des colonnes disponibles, e.g. une en phase inverse pour la rétention des toxines lipophiles et une HILIC pour les molécules polaires (Lajeunesse et al., 2012). C'est cette stratégie que nous avons choisie lors du développement de notre procédure d'analyse multi-cyanotoxines pour le criblage des mollusques marins (*cf.* annexe 2 chapitre 5). En effet, ces techniques présentent un intérêt certain pour le criblage rapide des cyanotoxines à partir de différentes matrices, tout en bénéficiant de la sensibilité et la sélectivité des méthodes CL-SM/SM. Avec l'utilisation de colonnes UPLC, la durée d'analyse est même considérablement réduite (e.g. < 13 min pour Oehrle et al. (2010)). A ce jour, les méthodes multi-cyanotoxines ont cependant été majoritairement utilisées pour des échantillons de cyanobactéries et des eaux de surface, et pas sur des matrices marines complexes comme les mollusques bivalves consommés par l'homme (e.g. moules et huîtres).

Les méthodes CL-SM/SM sont limitées par la disponibilité des étalons de toxines (*i.e.* peu sont commercialisés) et peuvent être impactées par des effets matrices conséquents (Lajeunesse et al., 2012), mais ce comme toutes les méthodes analytiques. Les mécanismes à l'origine des effets matrices sont méconnus mais ils pourraient résulter de la compétition pour l'ionisation dans l'interface CL-SM/SM entre l'analyte et des composés co-élus (Matuszewski et al., 2003). Par conséquent, il est possible d'observer soit une augmentation soit une suppression de signal. Pour réduire voire supprimer les effets matrices, il est préférable de disposer d'étalons internes. Ceux-ci

correspondent le plus souvent à un isotope stable de l'analyte d'intérêt [e.g. U-[¹⁵N₅]-CYN ou ¹⁵N-MCs (Sano et al., 2011; Kittler et al., 2014)] et permettent de corriger à la fois les effets matrices sur l'analyse mais également les pertes liées à la préparation des échantillons (Van De Steene et al., 2006). Cependant, ils sont rares et difficiles à obtenir (e.g. 6 à 18 mois de culture de cyanobactéries en présence de nutriments marqués puis purification et caractérisation de la structure). En l'absence de standards internes, la purification par SPE est une bonne alternative (Chambers et al., 2007) mais les ajouts dosés peuvent également convenir pour compenser les effets matrices (Ito and Tsukada, 2002).

Le mode de détection le plus utilisé en spectrométrie de masse en tandem est le mode MRM (multiple reaction monitoring). Bien que très pratique pour la quantification des échantillons et très sélectif (*i.e.* excellente sensibilité et augmentation du nombre de critères d'identification des molécules suite à leur fragmentation), il n'autorise qu'une analyse « ciblée » des toxines. A l'inverse, l'utilisation du mode précurseur d'ions permet de détecter davantage de toxines, en se basant sur un fragment spécifique caractéristique d'une famille de toxines [e.g. m/z 135 est caractéristique de l'Adda des MCs et NOD et son utilisation en mode précurseur d'ions permettra de retrouver tous les ions parents dont la fragmentation fournit un fragment m/z 135 soit environ 80 % des analogues des MCs et NODs, (Hiller et al., 2007)]. Mais de nouvelles technologies comme la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) constituent la meilleure alternative. En utilisant la masse exacte des composés, il est ainsi possible d'effectuer une analyse non ciblée par confrontation des résultats avec des bases de données en accès libre ou développées en interne par chaque laboratoire (Lajeunesse et al., 2012; Li et al., 2013; Schymanski et al., 2015). L'utilisation des modes « full scan » et « all ions » permettra en plus de pouvoir retraiter les chromatogrammes obtenus *a posteriori* afin de s'intéresser à de nouvelles toxines (e.g. nouveaux analogues, autre famille non considérée à la base).

Tableau 24 : résumé des caractéristiques de certaines méthodes d'analyses multi-toxines CL-SM ou CL-SM/SM

Toxines	Matrices	Préparation	Chromatographie	Détection (mode)	LOD/LOQ en pg sur colonne (dans la matrice)	Rendements d'extraction (%)	Effet matrice (% du signal restant)	Référence
12 toxines (MCs, NOD, ATX, STX)	Phyto-plancton	MeOH/eau (50 :50) avec sonications	RP : Aqua C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) 36 min	SM (SIM)	500 – 1000 / –	96 – 114	–	Dahlmann et al., 2003
23 toxines (PSTs, ATX, CYNs, MCs)	Cyano-bactéries	ACN/eau/FA (80 : 19,9 : 0,1) Mixage	HILIC : TSK gel Amide-80 (250 x 2,0 mm, 5 µM) 32 min	SM (SIM) et SM/SM (SRM)	24 – 1330 / –	–	–	Dell'Aversano et al., 2004
19 toxines (PSTs, ATX, CYN, MCs et NOD)	Cyano-bactéries et eaux	MeOH/0,1 M AcOH (50 :50) avec sonications	RP : Luna C18 (150 x 3,0 mm, 3 µm) 30 min	SM/SM (Prec)	0,6 – 700 / 1 – 1150	–	–	Hiller et al., 2007
10 toxines (CYN, ATX, MCs et NOD)	Eaux de surface	Congélation/décon-gélation puis sonication	RP : Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) 12.8 min	SM/SM (MRM)	1,5 – 3,1 / –	88 – 110	–	Oehrle et al., 2010
9 toxines (CYN, ATX, MCs et NOD)	Eaux de surface	Sonication puis SPE en série (C18 et charbon graphite)	RP : Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm) 70 min	SM (SIM)	0,1 – 5 / – (20 – 500 ng.mL ⁻¹ / –)	83 – 104	100 – 120	Yen et al., 2011
12 toxines (CYN, ATX, DTX-1, OA, 7 MCs et NOD)	Cyano-bactéries et eaux	AcOH 15% puis sonication et SPE (C18)	RP : Hypersil Gold C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) 40 min	SM/SM (SRM)	1 – 20 / 4 – 60	0,1 - 141	–	Chen et al., 2012
7 toxines 4 polaires (ATX, CTN, LWTX-1 et STX) et 3 apolaires (MCs et NOD)	Cyano-bactéries	MeOH/0,1 M AcOH (50 :50) avec sonications	HILIC : TSK gel Amide-80 (150 x 2,0 mm, 3 µM) 30 min RP : Gemini C18 (150 x 2 mm, 3 µm) 20 min	SM/SM (MRM) et QToF (full scan et SM/SM)	– / – (2 – 540 / 7 – 1800 pg)	88 – 105*	14 – 83	Lajeunesse et al., 2012
5 toxines (ATX et MCs)	Eaux de surface et sédi-ments	Congélation-décon-gélation	RP : Luna C18 + pré-colonne (150 x 2,0 mm, 5 µm) 25 min	SM/SM (SRM)	– / – (33 – 103 ng.g ⁻¹ / –)	62 – 93	96 – 127	Rivetti et al., 2015

RP : reverse phase ; ACN : acétonitrile ; TFA : acide trifluoroacétique ; HFBA : acide heptafluorobutyrique ; AF : formiate d'ammonium ; FA : acide formique ; SIM : single ion monitoring ; SRM : selected reaction monitoring ; AcOH : acide acétique ; Prec : precursor ion scan mode ; MRM : multiple reaction monitoring ; AA : Acétate d'ammonium ; QToF : Quadrupole-time-of-flight ; * rendements après correction par ajouts dosés.

3.2 Méthodes biologiques/biochimiques

Même si la spectrométrie de masse est un outil indispensable pour l'analyse sensible et surtout sélective des cyanobactéries, d'autres méthodes existent (figure 52) et sont généralement utilisées pour effectuer un criblage rapide.

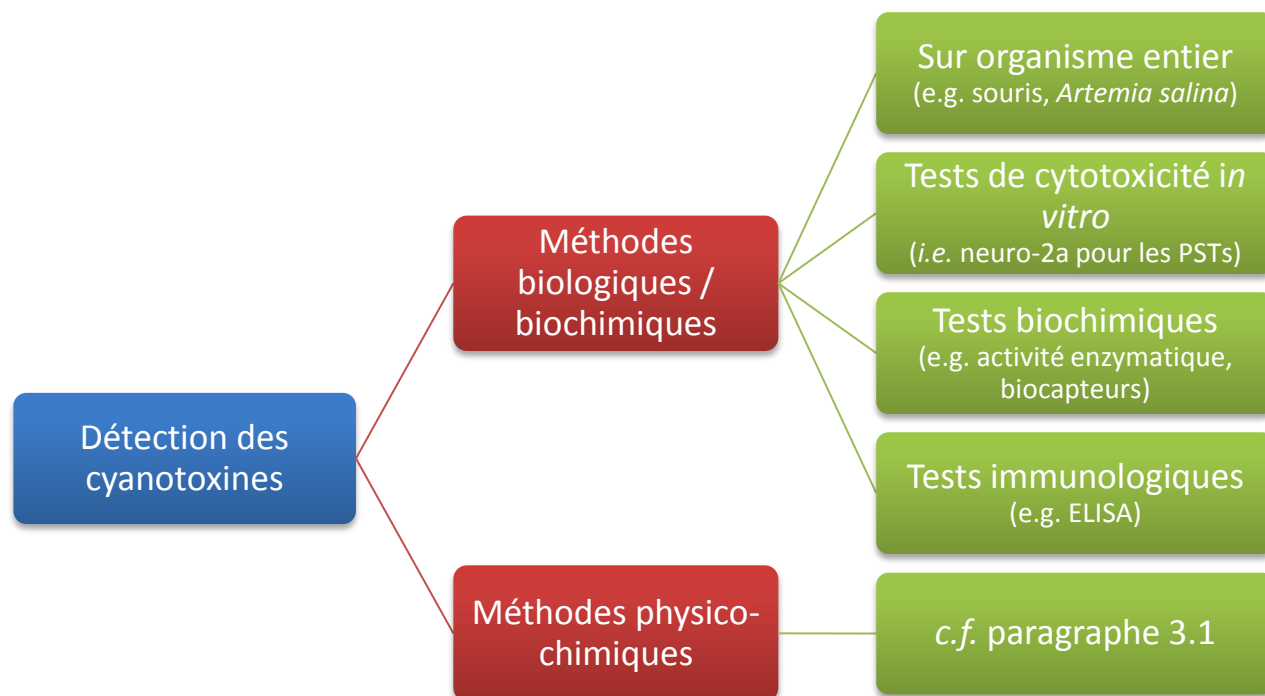


Figure 52 : différentes méthodes d'analyse des cyanotoxines

Parmi les bioessais sur organismes entiers, le test souris a été utilisé pendant longtemps pour la détection des cyanotoxines. Il permet d'avoir une mesure de la toxicité aiguë *in vivo* globale d'un échantillon et de détecter d'éventuelles nouvelles toxines mais il manque de sensibilité, de spécificité et soulève des questionnements éthiques (Falconer, 1993). Par conséquent, d'autres organismes ont été testés, e.g. le crustacé *Artemia salina* [voir la liste dans (Chorus and Bartram, 1999)] mais ce test manque aussi de sélectivité et est fortement impacté par les effets matrices.

La découverte des cibles moléculaires des cyanotoxines a permis le développement de nombreux tests biochimiques. Notamment, ceux de la mesure d'activité enzymatique qui utilisent la capacité des hépatotoxines à inhiber les protéines phosphatases (Mackintosh et al., 1990). Ces tests sont basés sur la mesure de l'effet d'inhibition des MCs sur la libération de phosphate à partir d'un substrat de protéines phosphorylées, qui peut être quantifiée en mesurant la libération de *p*-nitrophénol pour le test

colorimétrique (Ward et al., 1997). Ils sont sensibles, rapides et facilement accessibles. Cependant, tous les analogues n'ont pas la même sensibilité. De plus, ce test manque de spécificité (*i.e.* aucune identification des analogues donc les résultats sont exprimés en toxicité équivalente à la MC-LR) et aurait tendance à surestimer les concentrations réelles de MCs (Nicholson and Burch, 2001). Il peut cependant constituer un premier outil de criblage pour identifier des échantillons d'intérêt.

Le test ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) est un test immunologique qui repose sur la reconnaissance structurale des toxines (*i.e.* antigènes) par des anticorps qui ont été générés contre cette toxine. La réaction antigène-anticorps est le plus souvent quantifiée grâce à une réaction colorée. De nombreux kits sont maintenant commercialisés [e.g. voir la liste dans (Weller, 2013)]. Ces tests bénéficient des mêmes avantages et inconvénients que la mesure d'activité enzymatique (e.g. simples, suffisamment sensibles et rapides pour faire un criblage). Ils sont néanmoins limités par leurs réactions croisées relativement faibles [e.g. surtout ceux développés contre la STX qui ne montrent aucune réaction croisées avec les C-toxines (Nicholson and Burch, 2001)], la possibilité de générer des faux-positifs, même sur les kits récents (Aranda-Rodriguez et al., 2015) et ils sont sensibles aux effets matrices [e.g. comme le test de Abraxis pour la CYN dans le sérum et l'urine, (Foss and Aubel, 2013)]. Ils doivent être considérés comme des techniques de criblage, fournissant un résultat semi-quantitatif de la quantité totale des toxines ou de la toxine en cas d'utilisation d'anticorps monoclonaux.

Ces dernières années, l'utilisation des biocapteurs [*i.e.* outils qui associent une composante biologique (e.g. enzymes, anticorps, cellules) à un transducteur qui transforme la reconnaissance moléculaire en un signal mesurable] est en plein essor [voir les revues de Vilarino et al. (2013) et Weller 2013]]. Ainsi, le mécanisme moléculaire d'action de l'anatoxine-a et ses analogues (*i.e.* agonistes de l'acétylcholine) a mené au développement de tests utilisant des électrocytes de la raie électrique (*Torpedo*, riches en récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine) via la mesure de dépolarisation de fluorescence liée à l'interaction toxine-récepteur (Aráoz et al., 2008; Sanchez et al., 2014).

En fait les deux types de méthodes sont complémentaires. Les tests biologiques/biochimiques en tant qu'outils de criblage (e.g. en cas d'analyse de nombreux échantillons) et la CL-SM/SM pour l'identification et la quantification des toxines recherchées dans les matrices d'intérêts.

4. Accumulation des cyanotoxines

4.1 Présence dans l'environnement

Les cyanobactéries sont des organismes ubiquitaires. Elles peuvent proliférer dans toutes les masses d'eau et donc les toxines qu'elles produisent sont retrouvées partout à travers le monde (tableau 25). Les données présentées dans ce tableau confirment que les microcystines semblent être les toxines les plus rapportées [*i.e.* dans 50-75 % des cas de blooms selon (Ettoumi et al., 2011)]. Excepté pour la nodularine (retrouvée dans les eaux saumâtres de la mer Baltique et des estuaires en Australie), et à de rares exceptions près [e.g. dans la baie de Monterey, océan Pacifique, Californie (Miller et al., 2010)], les cyanotoxines sont très majoritairement rapportées dans les eaux douces.

Les concentrations observées sous forme dissoute sont généralement les plus faibles (e.g. en général $\leq 50 \mu\text{g.L}^{-1}$). En effet, les toxines sont rapidement diluées, adsorbées, dégradées ou accumulées lorsqu'elles se retrouvent dans l'eau (Ibelings and Chorus, 2007).

Cependant, étant des métabolites intracellulaires, des concentrations largement plus élevées de cyanotoxines peuvent être observées lors de l'apparition de blooms, de mousses ou d'amas (e.g. jusqu'à 2900 mg.L^{-1} pour les microcystines ou $8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$ pour l'anatoxine-a). La CYN est une exception puisque les concentrations extracellulaires peuvent parfois dépassées celles à l'intérieur des cellules (Rücker et al., 2007; Wormer et al., 2008).

Tableau 25 : exemples de concentrations de cyanotoxines observées dans le monde (forme dissoute, particulaire).

Pays	Cyanotoxines	Concentrations (µg.L ⁻¹ ou µg.g ⁻¹ DW*)	Référence
ASIE-OCEANIE			
Chine	MC-RR	34,2	Liu et al., 2011
	MC-LR et RR	2,73	Wang et al., 2007
Corée du sud	ATX	1444*	Park et al., 1998
	MCs	1500*	
Liban	CYN	1,4	Fadel et al., 2014
Australie	CYN	92	Chiswell et al., 1999
	STX	30	Orr et al., 2004b
	NOD	220	McGregor et al., 2012
Nouvelle-Zélande	MCs	10 900*	Wood et al., 2006
AMERIQUE			
Argentine	ATX	0,007	Ruiz et al., 2013
	MCs	920	Conti et al., 2005
Brésil	MCs	1,3	Vieira et al., 2005
	STX	0,052	Molica et al., 2005
Etats-Unis	CYN	100	Falconer and Humpage, 2006
	MC-LA	100	Miller et al., 2010 et
	MCs	2,9.10 ⁶ (mousse)**	Mekebri et al., 2009
AFRIQUE			
Afrique du sud	MCs	1,28	Ballot et al., 2014
	MCs	27 198 (mousse)	Oberholster et al., 2009
Kenya	ATX	223*	Ballot et al., 2004
	MCs	4593*	
Maroc	MCs	95,4	El Ghazali et al., 2011
Ouganda	MCs	10,2	Okello et al., 2010
Tunisie	MCs	3230*	El Herry et al., 2008
EUROPE			
Allemagne	ATX	13,1	Bumke-Vogt et al., 1999
	CYN	12,1	Rücker et al., 2007
	MCs	5995*	Fastner et al., 1999
Espagne	CYN	9,4	Quesada et al., 2006
	MCs	70	Carrasco et al., 2006
	PSTs	26,1	Wörmer et al., 2011
Finlande (et reste de la mer Baltique)	NODs	42300	Mazur-Marzec et al., 2013
	MCs	42	Spoof et al., 2003
	STX	1000 (bloom)	Rapala et al., 2005
France	ATX	8000*	Gugger et al., 2005
	CYN	1,95	Brient et al., 2009
	MCs	89	Ledreux et al., 2010
	STX	6,7	
Irlande	HATX	34	Furey et al., 2003
Italie	ATX	100*	Messineo et al., 2009 et 2010
	CYN	126	
	MCs	0,226	
Pays-Bas	MCs	77	Waajen et al., 2014
	MCs	64 000 (mousse) 5270*	Lurling and Faassen, 2013

*concentrations en $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW ; **une des concentrations les plus fortes rapportées à ce jour d'après les auteurs.

Les valeurs de ces concentrations sont à nuancer pour certaines puisqu'elles ont rarement été déterminées avec des méthodes sélectives (*i.e.* beaucoup de tests ELISA ou PP2A) et difficiles à comparer vues les différentes préparations d'échantillon et méthodes analytiques employées. Néanmoins, l'utilisation de la spectrométrie de masse est de plus en plus fréquente et a permis de mettre en évidence la forte diversité de toxines qui peuvent coexister dans un même plan d'eau (e.g. 42 analogues de MCs rapportés par Ballot et al. (2014) dans le barrage d' Hartbeespoort en Afrique du sud). Le développement de méthodes analytiques CL-SM/SM multi-cyanotoxines constitue une avancée considérable pour le criblage rapide et sensible des échantillons environnementaux. Ainsi, Rodriguez et al. (2014) ont pu rapporter la présence d'anatoxine-a, d'homoanatoxine-a et leurs produits de dégradation ainsi que de la MC-LR dans des eaux collectées en Allemagne (*i.e.* douces et saumâtres), malgré les faibles concentrations (entre 0,01 et 0,58 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Lors de la présence de cyanobactéries toxiques et notamment lorsqu'elles forment des blooms, les organismes aquatiques sont directement exposés à leurs toxines (*i.e.* sous forme dissoute et/ou sous forme particulaire) ce qui a parfois entraîné des intoxications voire des mortalités.

4.2 Interactions avec les organismes aquatiques

4.2.1 Contaminations naturelles

Bien que les cyanobactéries soient considérées comme des ressources alimentaires mineures [e.g. elles peuvent prendre certaines formes (e.g. colonies, mucus) ou synthétiser des toxines qui limitent leur consommation (Kozlowsky-Suzuki et al., 2012)], les organismes filtreurs (e.g. mollusques bivalves) ou brouteurs (e.g. crustacés, gastéropodes, poissons planctophages) peuvent directement les consommer (Ibelings and Chorus, 2007) et donc accumuler leurs toxines (tableaux 26 – 28).

Tableau 26 : exemples de concentrations de cyanotoxines rapportées dans les crustacés. Lorsque plusieurs organes ont été analysés, les concentrations (maximales quand disponibles ou moyennes) ont été rapportées pour chaque organe. Lorsque plusieurs espèces ont été analysées dans la même étude, seules les concentrations maximales ont été rapportées.

Organisme (espèce)	Organes	Lieu	Toxine	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)*	Référence
Ecrevisse (<i>Cherax quadricarinatus</i>)	GD, muscle	Australie	CYN	4,3 ; 0,9	Saker and Eaglesham, 1999
Crevette (2 espèces)	Estomac, GD, gonade, branchies, muscle	Chine	MC	12,4 ; 8,4 ; 2,2 ; 1,3 ; 0,53	Chen and Xie, 2005b
Crevette (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	GD, muscle	Etats-Unis	MC	55 ; 0,1 FW	Zimba et al., 2006
Ecrevisse (<i>Procambarus clarkii</i>)	Estomac, intestin, gonade, branchies, GD, muscle	Chine	MC	10 ; 2,3 ; 0,93 ; 0,27 ; 0,08 ; 0,05	Chen and Xie, 2005b
Ecrevisse (<i>Astacus astacus</i>)	GD, branchies, estomac, muscle, cerveau, gonade	Grèce	MC	0,77 ; 0,70 ; 0,33 ; 0,33 ; 0,31	Papadimitriou et al., 2012
Crabe (NR)	Muscle	Brésil	MC	0,103	Magalhaes et al., 2003
Crabe bleu (<i>Callinectes sapidus</i>)	GD, muscle, viscère	Etats-Unis	MC	0,82 ; 0,11 ; 0,07	Garcia et al., 2010
Crevette (NR)	Viscère, muscle	Australie	NOD	6,4 ; 0,005 FW	Van Buynder et al., 2001
Crevette (<i>Palaemonetes argentinus</i>)	Entier	Argentine	NOD	0,11 FW	Galanti et al., 2013

GD : Glande digestive ; NR : non rapporté ; FW : (Fresh weight) *i.e.* concentration rapportée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids humide (les concentrations en poids sec seraient environ 4-5 fois plus élevées) ; *quand plusieurs concentrations sont rapportées, elles le sont dans l'ordre d'apparition des organes considérés

Les crustacés sont un sous-embranchement des arthropodes et incluent les crevettes, écrevisses et crabes notamment (*i.e.* des espèces importantes pour l'économie car largement consommées par l'homme). Ils peuvent se nourrir de phytoplancton dont les cyanobactéries. Par conséquent, des cyanotoxines ont été rapportées dans ces organismes, majoritairement les MC et NOD (tableau 26). Les concentrations retrouvées sont variables entre les différentes espèces mais aussi en fonction des organes considérés. La distribution des toxines semblent se faire majoritairement dans l'estomac et la glande digestive, même si globalement tous les organes peuvent également en contenir.

Récemment, Galanti et al. (2013) ont détecté de la nodularine dans une espèce de crevette en Argentine avec une méthode CL-SM/SM. Ces résultats sont importants puisqu'ils font état de la présence de NOD à la fois dans l'eau d'un réservoir et dans les crevettes, en dehors des zones où est classiquement rapportée cette toxine produite par *Nodularia spumigena* (*i.e.* mer Baltique et Australie).

Tableau 27 : exemples de concentrations de cyanotoxines rapportées dans les mollusques bivalves et les gastéropodes. Lorsque plusieurs organes ont été analysés, les concentrations (maximales quand disponibles ou moyennes) ont été rapportées pour chaque organe. Lorsque plusieurs espèces ont été analysées dans la même étude, seules les concentrations maximales ont été rapportées.

Organisme	Organes	Lieu	Toxine	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)*	Référence
BIVALVES					
Moule (<i>Alathyrus pertexta pertexta</i>)	Entier	Australie	CYN	0,56 FW	Anderson et al 2003 dans Gutierrez- Praena et al. (2013)
Moules (4 espèces)	GD, intestins, branchies, pied et reste	Chine	MC	39 ; 21 ; 0,64 ; 0,58 ; 0,61	Chen and Xie, 2005a
Moule (NR)	Entier	Etats-Unis	MC	2,78 FW	Mekebri et al., 2009
Moule (<i>Anodonta cygnea</i>)	GD, estomac, branchies, pied, manteau	Grèce	MC	1,35 ; 1,19 ; 1,20 ; 1,18 ; 1,12	Papadimitriou et al., 2012
Moule (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	Entier	Grèce	MC	0,142 FW	Vareli et al., 2012
Moules (<i>Anodonta anatina</i> et <i>Unio pictorum</i>)	Entier	Lituanie	MC	88,4	Barda et al., 2015
Moule (NR)	Entier	Australie	NOD	2,5 FW	Van buyder et al., 2001
Moule (<i>Mytilus edulis</i>)	Entier	Mer Baltique	NOD	80	Sipiä et al., 2008
Telline (<i>Macoma balthica</i>)	Entier	Mer Baltique	NOD	0,13	Sipiä et al., 2002
GASTEROPODES					
Escargots (3 espèces)	Entier	Lituanie	MC	2,18	Barda et al., 2015
Escargot (<i>Bellamya aeruginosa</i>)	GD, intestin, gonade, pied	Chine	MC	4,1 ; 1,7 ; 0,7 ; 0,04	Chen et al., 2005
Escargot (<i>Sinotaia histrica</i>)	Intestin, gonade, GD, pied	Japon	MC	23,2 ; 22,7 ; 8,9 ; 4,5	Xie et al., 2007
Escargot (<i>Pomacea patula catemacensis</i>)	Entier	Mexique	CYN	0,003**	Berry and Lind, 2010

GD : Glande digestive ; NR : non rapporté ; FW : (Fresh weight) *i.e.* concentration rapportée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids humide (les concentrations en poids sec seraient environ 4-5 fois plus élevées) ; *quand plusieurs concentrations sont rapportées, elles le sont dans l'ordre d'apparition des organes considérés ; **non confirmé par UV ni SM

Les mollusques bivalves incluent de nombreuses espèces (e.g. moules, huîtres, palourdes) et comme les gastéropodes, ils se nourrissent de microalgues dont les cyanobactéries. Leurs types d'alimentations respectifs, basés sur la filtration et le broutage les rendent particulièrement susceptibles d'accumuler des cyanotoxines (tableau 27). Les hépatotoxines ont largement été rapportées dans les mollusques dans de nombreux pays. Les résultats montrés dans ce tableau révèlent qu'en fonction des

espèces, les toxines peuvent s'accumuler préférentiellement dans différents organes, l'hépatopancréas (ou glande digestive) semblant malgré tout l'organe cible.

Dernièrement, Vareli et al. (2012) ont rapporté la présence de MC dans des moules prélevées dans la mer Méditerranée. Bien que les organismes producteurs de ces toxines n'aient pas encore été identifiés, il semble donc possible que des mollusques marins puissent contenir des cyanotoxines classiquement retrouvées dans les milieux dulcicoles.

Tableau 28 : exemples de concentrations de cyanotoxines rapportées dans les poissons. Lorsque plusieurs organes ont été analysés, les concentrations (maximales quand disponibles ou moyennes) ont été rapportées pour chaque organe. Lorsque plusieurs espèces ont été analysées dans la même étude, seules les concentrations maximales ont été rapportées.

Organisme	Organe	Lieu	Toxine	Concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$)*	Référence
Brème (<i>Abramis brama</i>)	Branchie, foie, muscle	Pologne	ATX	37 ; 18 ; 0,6 FW	Pawlik-Skowrońska et al., 2013
Poisson arc-en-ciel (<i>Melanotaenia eachamensis</i>)	Viscère	Australie	CYN	1,2	Saker and Eaglesham, 1999
Truite (<i>Salmo trutta</i>)	Viscère, muscle	Italie	CYN	0,003 ; 0,0008 FW	Messineo et al., 2010
Flet, Brème, gardon (<i>Platichthys flesus</i> , <i>Abramis brama</i> , <i>Rutilus rutilus</i>)	Foie	Lituanie	NOD	0,42 - 0,80	Barda et al., 2015
Carpe (<i>Aristichthys nobilis</i>)	Intestin, foie, rein, muscle, branchies	Chine	MC	86 ; 2,8 ; 1,7 ; 0,9 ; 0,07	Chen et al., 2007
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Foie, muscle	Brésil	MC	32 ; 0,012	Deblois et al., 2008
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Boyaux, foie, reins, muscle	Egypte	MC	0,82 ; 0,53 ; 0,40 ; 0,10	Mohamed et al., 2003
Perchaude (<i>Perca flavescens</i>)	Muscle, foie	Etats-Unis	MC	0,50 FW	Mekebri et al., 2009
Gobi (<i>Neogobius melanostomus</i>) flet (<i>Platichthys flesus</i>)	Foie, muscles	Mer Baltique	NOD	0,92 ; 0,35	Mazur-Marzec et al., 2013

NR : non rapporté ; FW : (Fresh weight) i.e. concentration rapportée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids humide (les concentrations en poids sec seraient environ 4-5 fois plus élevées) ; *quand plusieurs concentrations sont rapportées, elles le sont dans l'ordre d'apparition des organes considérés.

Les poissons peuvent accumuler les toxines de cyanobactéries (tableau 28) soit via leur alimentation (e.g. poisson planctophages) soit via les branchies, lorsque les toxines sont présentes sous forme dissoute (Ibelings and Chorus, 2007). Il semblerait néanmoins que l'accumulation passive soit négligeable. Certaines espèces carnivores sont situées au sommet des chaînes alimentaires et peuvent donc se nourrir d'organismes des niveaux inférieurs contaminés (e.g. les gastéropodes ou bivalves). Bien qu'il puisse sembler légitime que les poissons carnivores contiennent davantage de toxines, les résultats

sont plutôt contrastés et il ne semble pas y avoir de lien particulier entre le type d'alimentation et les concentrations retrouvées dans les organismes (Ibelings and Chorus, 2007; Kozlowsky-Suzuki et al., 2012).

Récemment, Pawlik-Skowrońska et al. (2013) ont rapporté la présence d'anatoxine-a dans des brèmes prélevées dans un lac en Pologne. Très peu de données sont disponibles pour cette cyanotoxine mais les concentrations retrouvées étaient supérieures à celles des microcystines dans les poissons analysés. Il est donc possible que les organismes aquatiques soient exposés à différentes cyanobactéries toxiques résultant en une contamination multiple.

Les cyanotoxines ont été retrouvées dans de nombreux organismes aquatiques à travers le monde entier. Les concentrations rapportées semblent être fonction des espèces, des organes considérés et indirectement liées aux voies et à la durée d'exposition, aux capacités de détoxification des espèces ainsi qu'aux méthodes d'analyses (Ferraio-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011). Encore une fois, les données de la présence de cyanotoxines dans les organismes aquatiques concernent majoritairement les microcystines. Cette tendance est également reflétée par l'analyse bibliométrique réalisée par Merel et al. (2013a) qui rapportent que 50 % des études portant sur les cyanotoxines se sont intéressées spécifiquement aux microcystines. Par conséquent, il y a davantage d'informations sur les microcystines que les autres cyanotoxines. Néanmoins, l'intérêt pour ces dernières et notamment la cylindrospermopsine est en croissance exponentielle.

4.2.2 Contaminations artificielles

Dans cette partie, nous avons étudié les contaminations artificielles de mollusques bivalves avec des cyanobactéries productrices de toxines. A titre de comparaison, nous avons également inclus des études utilisant des dinoflagellés et diatomées pour contaminer des bivalves marins. Cette recherche bibliographique nous intéressait pour savoir si des mollusques marins peuvent consommer des cyanobactéries toxiques et accumuler leurs toxines.

Dans la plupart des études de contaminations artificielles rapportées dans le tableau 29, les bivalves se nourrissaient normalement à partir des microalgues toxiques et ne semblaient pas impactés par leur toxicité (Osswald et al., 2008). Notamment, Pires et al. (2004) ont observé une alimentation préférentielle des dreissènes sur *Microcystis* plutôt que *Nannochloropsis*. Néanmoins, certains ont rapporté un effet néfaste d'une trop forte concentration cellulaire (e.g. $> 10^6$ cellules.mL⁻¹, Negri et al.,

1995) voire des toxines (Pereira et al., 2004, Jauffrais et al., 2012, Medhioub et al., 2012) sur le comportement alimentaire.

En général l'absorption des toxines (*i.e.* le pourcentage de toxines retrouvées dans les organismes, par rapport à la concentration présente dans leur milieu d'exposition) était relativement faible [e.g. 24 – 55 % pour MC-LR, 10 – 20 % pour NOD (Vasconcelos et al., 1995 ; Strogyloudi et al., 2006)]. Bien que la durée d'exposition ainsi que les concentrations ou formes de cellules (e.g. vivantes ou lyophilisées) soient variables, les toxines sont détectées dans les bivalves assez rapidement (e.g. dès 6 h pour les azaspiracides dans *M. edulis*, dès le second jour pour MC-LR dans *M. galloprovincialis*, ou CYN dans *A. cygnea*). A l'exception de la CYN (*i.e.* retrouvée en majorité dans l'hémolymph) les autres toxines sont plutôt concentrées dans les glandes digestives (≤ 96 %).

Une différence entre espèces a été mise en évidence pour l'accumulation des toxines, notamment avec l'acide domoïque, une toxine produite par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* (présentée ici à titre de comparaison) accumulée en moyenne 3 fois plus dans les moules que dans les huîtres marines (Mafra et al., 2010).

L'élimination des toxines a aussi été étudiée, suite à la contamination par les microalgues toxiques. Il semblerait que la décontamination soit bi-phasique, avec une première phase d'élimination rapide des toxines, suivie par une élimination plus lente (Jauffrais et al., 2012). Parfois, après la première étape de décontamination rapide, une augmentation de la concentration en toxines est observée (Vasconcelos et al., 1995 ; Saker et al., 2004). Cependant, les bivalves semblent pouvoir éliminer assez rapidement les toxines (e.g. en 2 – 3 semaines), bien que des différences soient notables entre les espèces et les toxines considérées. Ce processus peut néanmoins être long pour certaines interactions toxine-bivalve [e.g. (Blanco et al., 2002) rapportent la présence d'AD pendant 295 jours dans la coquille Saint-Jacques].

Par ailleurs, lors de la contamination et de la décontamination, des échanges de toxines entre les tissus ont été observés (Pereira et al., 2004 ; Strogyloudi et al., 2006 ; Mafra et al., 2010). Certains ont également mis en évidence une métabolisation (*i.e.* modification du profil toxinique entre les microalgues toxiques et les analogues retrouvés dans les bivalves) (Negri et al., 1995 ; Jauffrais et al. 2012).

Tableau 29 : Résumé de quelques expériences en laboratoire avec des mollusques exposés à des microalgues toxiques

Toxine	Organisme	Conditions	Concentrations	Décontamination	Référence
CYANOBACTERIES TOXIQUES					
ATX	<i>Mytilus galloprovincialis</i> *	<i>Anabaena</i> sp. 10 ⁵ cellules.mL ⁻¹ 1 fois/j pendant 15 j	0,007 µg.g ⁻¹ DW (53 % dans GD + cœur)	Plus de toxine détectée après 1 j	Osswald et al., 2008
CYN	<i>Anodonta cygnea</i>	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 3.10 ⁵ – 2x10 ⁶ cellules.mL ⁻¹ 1j/2, pendant 16 j	2,52 µg.g ⁻¹ DW (68 % dans hémolymph, 23% dans viscère)	Réduction de 50 % après 2 semaines	Saker et al., 2004
MC-LR	<i>Mytilus galloprovincialis</i> *	<i>Microcystis aeruginosa</i> 10 ⁵ cellules.mL ⁻¹ 1 fois/j pendant 16 j	10,5 µg.g ⁻¹ DW (94 % dans GD)	Plus de toxine détectée après 13 j	Vasconcelos, 1995
MC-LR	<i>Mytilus edulis</i> *	<i>Microcystis aeruginosa</i> 100 mg.L ⁻¹ 1 fois, pendant 3 j	337 µg.g ⁻¹ FW (total) 0,20 µg.g ⁻¹ FW (libre)	Plus de toxine détectée après 4 j (forme totale)	Williams et al., 1997
MC-LR	<i>Unio douglasiae</i>	<i>Microcystis ichthyoblabe</i> 15 mg.L ⁻¹ (lyophilisées) 1j/2 pendant 15 j	630 µg.g ⁻¹ DW dans GD	Réduction de 50 % en 3,1 j mais toujours 17,4 µg.g ⁻¹ après 15 j	Yokoyama and Park, 2003
MC-LR	<i>Dreissena polymorpha</i>	<i>M. aeruginosa</i> 2 mg C.L ⁻¹ 1 fois/j pendant 21 j	16,3 µg.g ⁻¹ DW (total) 10,1 µg.g ⁻¹ DW (libre)	Diminution rapide mais trace de toxine toujours détectée après 21 j	Pires et al., 2004
MC-LR	<i>Tapes semidecussatus</i> *, <i>Mytilus edulis</i> * et <i>Crassostrea gigas</i> *	Bloom <i>Microcystis</i> sp. 10,6 mg.L ⁻¹ 1 fois et pendant 21 j	1324 ng.mL ⁻¹ FW 979 ng.mL ⁻¹ FW 102 ng.mL ⁻¹ FW Dans GD	Plus de toxine dans palourde, 31 et 4 ng.mL ⁻¹ FW dans moule et huître après 21 j	Miller et al., 2010
NOD	<i>Mytilus edulis</i> *	<i>Nodularia spumigena</i> 50 µg chl a .L ⁻¹ 1 fois, pendant 4 j	13,8 µg.g ⁻¹ DW (57 – 89 % dans GD)	Réduction de 75 % après 3 j	Strogyloudi et al., 2006
PSTs	<i>Afahyria condolu</i>	<i>Anabhena circinalis</i> 2 x 10 ⁵ cellules.mL ⁻¹ 1 fois/j pendant 35 j	0,62 µg.g ⁻¹ FW (96 % dans viscère)	-	Negri and Jones, 1995
PSTs	<i>Anodonta cygnea</i>	<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> 1,4 x 10 ⁶ cellules.mL ⁻¹ 1 fois/j pendant 15 j	0,3 µg.g ⁻¹ FW (55 – 78 % dans GD)	Réduction 8,2 %.j ⁻¹ Trace détectée après 14 j	Pereira et al., 2004
MICROALGUES MARINES TOXIQUES					
AD	<i>Crassostrea virginica</i> *, <i>Mytilus edulis</i> *	<i>Pseudo-nitzschia multiseries</i> 3100 cellules.mL ⁻¹ 1 fois/j, pendant 4-7 j	79 µg.g ⁻¹ FW 480 µg.g ⁻¹ FW (70 – 90 % dans GD)	Réduction plus rapide dans moules, plus de toxine détectée après 14 j	Mafra et al., 2010
AZA	<i>Mytilus edulis</i> *	<i>Azadinium spinosum</i> 5x10 ³ – 10x10 ³ cellules.mL ⁻¹ En continue pendant 7 j	0,6 µg.g ⁻¹ FW (73 % dans GD)	Toujours ≥ 0,16 µg.g ⁻¹ détectée après 14 j	Jauffrais et al., 2012
SPX	<i>Crassostrea gigas</i> *	<i>Alexandrium mostenfeldii</i> 200 cellules.mL ⁻¹ En continue, pendant 4 j	0,68 µg.g ⁻¹ FW (83 % dans GD)	Réduction de 80 – 92% en 7 j	Medhioub et al., 2012

* Organismes marins ; GD : glande digestive ; AD : acide domoïque ; AZA : azaspiracides ; SPX : spirolides

L'accumulation des toxines par les bivalves filtreurs est donc un équilibre entre les processus régulant l'assimilation des toxines (*i.e.* ingestion et absorption des cellules toxiques) et leur élimination (*i.e.* réjection, échanges entre tissus, excrétion, dégradation et/ou biotransformation). Des différences sont observées au niveau des espèces quant à ces mécanismes.

Il semblerait que des organismes marins puissent accumuler des cyanotoxines à partir de cyanobactéries toxiques dulcicoles. Ainsi, lors d'un transfert eau douce-estuaire de cyanobactéries toxiques, il y a un risque que les bivalves marins se contaminent. Cette voie d'exposition pour l'homme (*i.e.* consommation d'organismes marins contenant des cyanotoxines) n'a pratiquement jamais été étudiée à ce jour. D'où notre intérêt pour l'analyse des moules et huîtres présente sur le littoral français métropolitain (*cf.* annexe 2 chapitre 5).

4.3 Bioaccumulation et biomagnification ou biodilution ?

Alors que la présence des cyanotoxines dans les organismes aquatiques ne fait aucun doute, leur bioaccumulation [*i.e.* en appliquant la définition donnée par Ibelings and Chorus (2007)] et/ou biomagnification ne sont pas clairement prouvées.

En plus de la détection des cyanotoxines dans les espèces rapportées dans les tableaux 26 – 29, des transferts trophiques ont été montrés, soit via l'étude d'une chaîne alimentaire dans un environnement donné, soit artificiellement en laboratoire mais en conditions contrôlées [voir les références dans Ferrao-Filho and Kozlowsky-Suzuki (2011)].

Concernant les microcystines, après avoir réalisé une méta-analyses de 42 articles, Kozlowsky-Suzuki et al. (2012) ont conclu que ces hépatotoxines étaient plutôt biodiluées (*i.e.* les concentrations retrouvées dans les consommateurs sont plus faibles que dans leurs sources d'alimentation). Parmi les hypothèses suggérées pour expliquer ce phénomène, la faible hydrophobicité des MCs, la préférence d'alimentation des espèces ainsi que leurs différentes capacités de détoxification joueraient un rôle. Néanmoins, les facteurs de biomagnification semblent positivement corrélés à la durée d'exposition, suggérant que le risque est plus grand pour les écosystèmes où des blooms persistent (e.g. systèmes eutrophes).

Le zooplancton semble être le meilleur bioaccumulateur de microcystines, suivi par les gastéropodes et les bivalves. Concernant les poissons, les planctophages contiennent en moyenne plus

de MCs que ceux ayant un autre régime alimentaire, notamment les carnivore, d'où la tendance à la biodilution (figure 53).

Un transfert de MC est donc possible, depuis les cyanobactéries vers les consommateurs primaires et parfois secondaires. Par exemple, Sotton et al. (2014) suggèrent que le zooplancton herbivore est un vecteur majeur de MCs dans un lac suisse. Il concentrerait les toxines à partir des cellules de *Planktothrix rubescens* et permettrait leur transfert vers les prédateurs zooplanctoniques et finalement vers les poissons zooplanctophages.

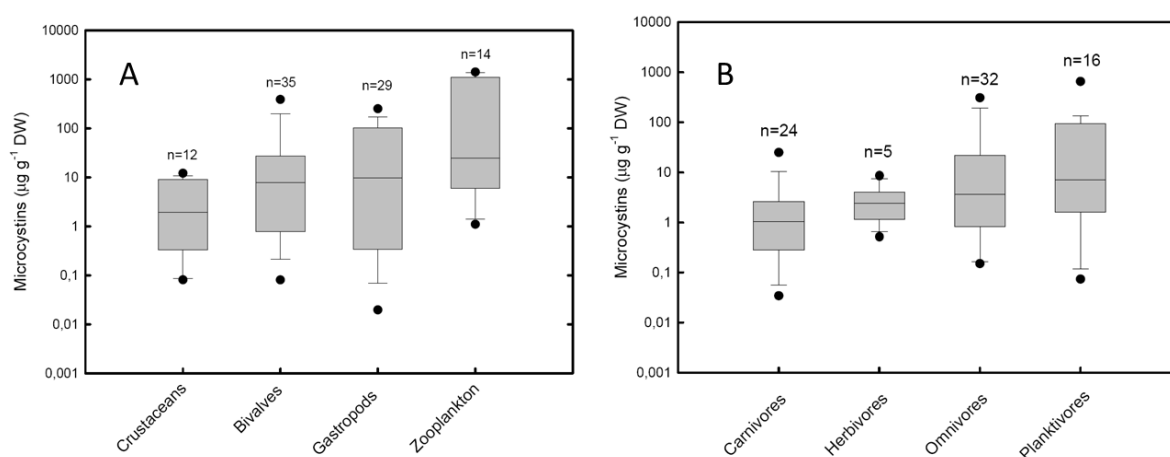


Figure 53 : concentrations de MCs (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW) dans (A) les invertébrés aquatiques et (B) les poissons en fonction de leur régime alimentaire. Les boîtes à moustaches représentent la médiane, les écarts-types, les 5^{ème} et 95^{ème} centiles des valeurs maximales retrouvées dans chaque étude, indépendamment des organes/tissus considérés. Les cercles noirs représentent les valeurs minimales et maximales rapportées. Le nombre d'échantillons, n, correspond aux nombres de données pour chaque taxon. En tout, 55 études ont été considérées pour les invertébrés aquatiques et 28 pour les poissons. Elles correspondent à des échantillons environnementaux ou à des expositions en conditions contrôlées (à des cultures de cellules vivantes ou lyophilisées de cyanobactéries ou à leurs toxines dissoutes). Repris de Ferrao and Kozlowsky-Suzuki (2011).

Kinnear et al. (2010) estiment que les données actuelles ne permettent pas de statuer pour la biomagnification de la cylindrospermopsine. Il semblerait que l'ordre de la capacité de bioaccumulation des organismes aquatiques soit le suivant : gastéropodes > bivalves > amphibiens > poissons. Un transfert de CYN n'est pas à exclure puisque dans ses travaux de thèse, Seifert estime que la présence de CYN et DoCYN dans le poisson chat (*Tandanus tandanus*) est liée à sa consommation de moules (*Corbiculina australis*) contaminées [voir référence dans Kinnear et al. (2010)].

De même, Ibelings and Chorus (2007), considèrent que les résultats qui supportent une bioaccumulation de nodularine sont rares. Néanmoins, le transfert vers les niveaux trophiques supérieurs semble se faire à partir de la consommation de moules contaminées [e.g. pour les flets mais également pour des oiseaux marins (Sipia et al., 2001; Sipiä et al., 2008)].

Les études d'accumulation des PSTs dans l'environnement marin sont nombreuses mais relativement rares via les cyanobactéries en eau douce (Ferrao and Kozlowsky-Suzuki, 2011). De même, peu de résultats sont disponibles pour l'anatoxine-a. Des études de contamination artificielles via l'alimentation à partir de souches de cyanobactéries toxiques semblent indiquer une possible bioaccumulation de PSTs dans la moule d'eau douce *Anodonta cygnea* (Pereira et al., 2004) tandis que l'anatoxine-a ne paraît pas s'accumuler dans la moule marine *Mytilus galloprovincialis*, probablement en raison d'une détoxification rapide (Osswald et al., 2008).

Bien que la bioaccumulation et le transfert de cyanotoxines existent, la biodilution des cyanotoxines, notamment les MCs, semble être le processus dominant. Les organismes accumulent les toxines majoritairement via leur alimentation, elles peuvent donc malgré tout se retrouver dans les consommateurs primaires et secondaires et constituer un risque sanitaire, en cas de consommation par l'homme.

Les proliférations excessives de cyanobactéries ont entraîné des intoxications humaines, bien que moins souvent rapportées que celles des animaux (annexe 9). Des réglementations et seuil ont donc été instaurés, ainsi que des réseaux de surveillance pour protéger au mieux les consommateurs et utilisateurs de plans d'eau.

5. Risques et réglementation liés aux cyanotoxines

5.1 Voies d'expositions

Pour l'homme, les voies d'expositions aux cyanotoxines les plus fréquentes sont la consommation d'eau (*i.e.* voie orale), les activités récréatives (*i.e.* voies orale, dermique et inhalation) et la consommation de produits contaminés (*i.e.* voie orale) (Codd et al., 2005; Ibelings and Chorus, 2007) (figure 54).

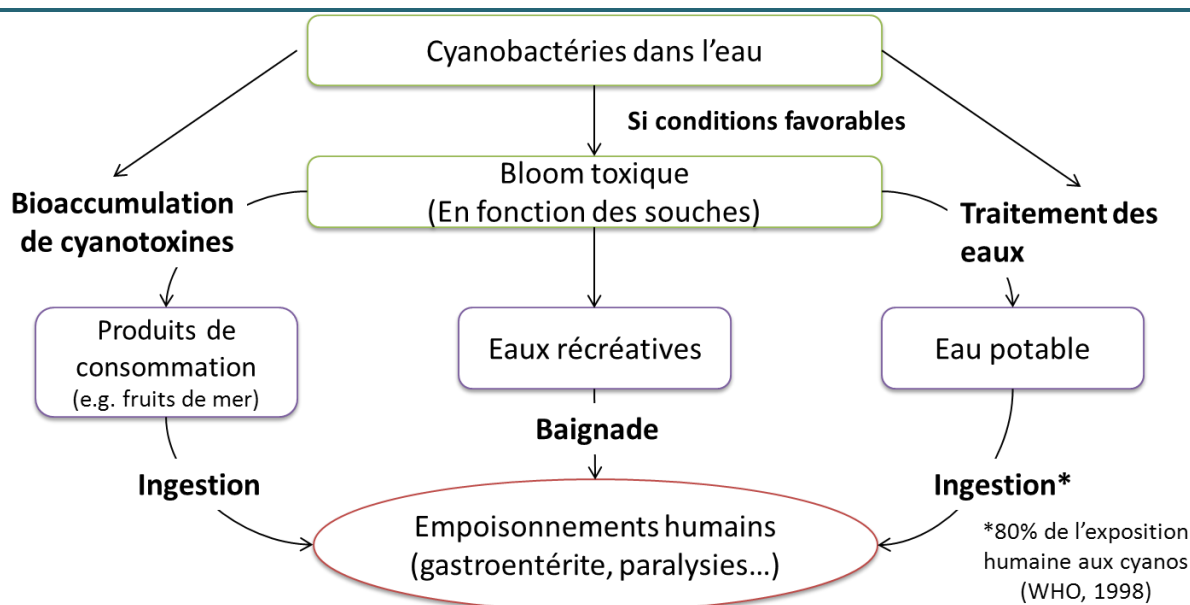


Figure 54 : différentes voies d'expositions aux cyanotoxines pour l'homme. Repris de Merel et al. (2013b).

En effet, si les plans d'eau contaminés par la présence de toxines servent comme eau de boisson, pour les activités récréatives ou l'irrigation des cultures, il y a un risque sanitaire pour l'homme. De même, si les organismes aquatiques contaminés constituent une ressource alimentaire pour l'homme (e.g. pisciculture, conchyliculture) il y a également un risque sanitaire réel. Une autre voie d'exposition de plus en plus étudiée est l'inhalation via l'aérosolisation des toxines ou des cyanobactéries [e.g. (Chorus and Bartram, 1999; Osborne et al., 2001; Backer et al., 2008; Backer et al., 2010; Chorus, 2012)].

Ces différentes voies d'exposition et les risques qui en découlent ont entraîné la mise en place de réglementations et valeurs de recommandation. L'annexe 9 recense certains cas d'intoxications humaines liées aux cyanobactéries et/ou à leurs toxines.

5.2 Règlementation et surveillance

5.2.1 Eaux de boissons et baignade

Les blooms de cyanobactéries toxiques dans les eaux de surface constituent un problème de santé publique majeure surtout lorsque ces dernières sont utilisées comme ressource d'eau potable. Par conséquent, des valeurs de recommandation, dérivées des données toxicologiques (e.g. NOAEL, No Observable Adverse Effect Level) ont été définies pour protéger au mieux les consommateurs et personnes pouvant être exposées lors d'activités récréatives (tableau 30).

Tableau 30 : réglementation et valeurs de recommandation ou d'alerte relatives aux cyanotoxines dans les eaux de boissons et récréatives (i.e. valeurs entre parenthèses). Repris de Chorus (2012).

	MCs	NOD	CYN	ATX	HATX	ATX-a(s)	STX
WHO	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-	-	-	-
Australie	1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Brésil	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Canada	1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ * (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	-	3,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-
France	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (13 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	-	-	-	-	-
Allemagne	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-	-
Pays-Bas	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	-	-	-	-	-
Nouvelle-Zélande	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (12 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Singapour	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ *	-	-	-	-	-	-
Turquie	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (25 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	-	-	-	-	-
Uruguay	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-	-	-	-
Afrique du sud	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-	-	-	-
Etats-Unis	1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	-	3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **	-	-	-	-

WHO : World Health Organisation ; *Valeur pour MC-LR uniquement, ** valeurs définies par EPA (2015)

De nombreux pays ont donc défini des réglementations pour les classes majeures de cyanotoxines pour lesquelles suffisamment de données toxicologiques sont disponibles (i.e. en suivant majoritairement les recommandations de WHO pour les MCs). La Nouvelle-Zélande est le pays ayant la réglementation la plus stricte, avec des valeurs maximales de 1 à 6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ définies pour l'ensemble des toxines alors que la France n'a instauré des valeurs standards que pour l'ensemble des microcystines. Les valeurs correspondant aux eaux récréatives sont plus élevées que pour les eaux de boisson, vue les plus faibles fréquences et quantités d'exposition.

En parallèle, des systèmes de surveillance des eaux récréatives, basés sur 2 ou 3 niveaux d'alerte avec des sévérités croissantes, ont été mis en place dans certains pays. Ils sont fonction de la concentration de microcystines, de la concentration ou du biovolume des cyanobactéries (Ibelings et al., 2014). Récemment, Stefanelli et al. (2014) ont montré la stabilité des microcystines, ainsi que la survie voire la croissance des cellules d'une souche de *Microcystis* exposée à des conditions mimant celles du tractus gastro-intestinal humain. Par conséquent, il y a un risque de contamination interne lors de l'ingestion de cyanobactéries toxiques, d'où l'importance de la surveillance des eaux de baignade.

5.2.2 Alimentation

A ce jour, l'évaluation du risque « cyanotoxines » via la consommation de produits contaminés est à ses débuts (Ibelings and Chorus, 2007; Mulvenna et al., 2012; Vareli et al., 2013) et peu de réglementations y sont associées (tableau 31).

Tableau 31 : exemples de valeurs de recommandation ou d'alerte pour la gestion des cyanotoxines dans les organismes aquatiques consommés. Modifié à partir de Ibelings et al. (2014)

Pays (Etat)	Toxines	Valeurs
Australie (Victoria)	CYN et DoCYN	18 – 39 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (organisme entier)
	équivalent MC-LR	24 – 51 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (organisme entier)
	PSTs	800 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ * (organisme entier)
Danemark	Pas de réglementation particulière. La récolte et la vente des moules n'est autorisée que quand aucune toxine n'est détectée dans l'eau	
France	MCs	5,6 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de filet de poisson (pour les adultes)
		1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ de filet de poisson (pour les enfants)
Etats-Unis (Californie)	MCs (LA, LR, RR, YR)	10 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$
	CYN	66 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$
	ATX	1100 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$
Etats-Unis (Oregon)	MCs	1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour les compléments alimentaires

*Valeur définie pour les PSTs produites par les dinoflagellés marins

L'Australie ne fournit pas de valeurs de recommandations pour les cyanotoxines dans les produits de consommation. Néanmoins, l'état de Victoria a défini des niveaux d'alerte pour la CYN et la DoCYN, les MCs (exprimées en équivalent MC-LR) ainsi que la STX, en utilisant les travaux de Mulvenna et al. (2012) (*i.e.* les valeurs dans ce tableau sont celles définies pour les personnes âgées entre 2 et 16 ans). La réglementation en France et en Europe concerne davantage les fruits de la mer et notamment les bivalves pour les toxines produites par les microalgues toxiques (EFSA, 2009). Néanmoins, des seuils ont été définis pour les MCs dans les parties consommables de poissons, pour les enfants et les adultes (Ibelings et al., 2014).

Cependant, en plus d'une intoxication indirecte via l'alimentation, les cyanobactéries et malheureusement parfois leurs toxines peuvent être directement ingérées sous forme de compléments alimentaires. Plusieurs espèces supposées non toxiques sont commercialisées, *e.g.* *Spirulina* sp. ou

Aphanizomenon flos-aquae (Gutierrez-Praena et al., 2013). Cependant, certaines souches utilisées ont parfois la capacité de produire des cyanotoxines, alors que les cyanobactéries récoltées directement dans l'environnement peuvent également contenir des contaminants toxiques. Ainsi, des cyanotoxines ou des effets toxiques ont été rapportées dans certains compléments alimentaires (Rellan et al., 2009; Heussner et al., 2012; Vichi et al., 2012). L'Oregon a donc défini une valeur de recommandation pour les BGAS (Blue green algae supplements) de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Gilroy et al., 2000). Pour être plus précis, Dietrich and Hoeger (2005) ont recommandé $0,24 - 2,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour un adulte de 60 kg, en fonction de sa consommation quotidienne (*i.e.* 1, 2 ou 10 g) voire trois fois moins si on applique un facteur supplémentaire lié à la capacité de promotion tumorale des microcystines.

Le risque provenant de la consommation d'aliments contaminés par les cyanotoxines (e.g. poissons, mollusques, crustacés) est moins documenté que pour les cyanotoxines dans les eaux de boisson et de baignade. Les raisons de cette différence ne sont néanmoins pas claires comme mentionné par Ibelings et al. (2014) puisque l'ingestion de toxines via l'alimentation peut représenter une voie d'exposition importante.

Chapitre 5 : Développement de deux méthodes CL-SM/SM multi-cyanotoxines et évaluation de leur présence sur le littoral français métropolitain

Contexte

Les milieux saumâtres comme la mer Baltique (Kahru et al., 1994) et dans une moindre mesure les estuaires et lac semi-arides australiens (Bolch et al., 1999), subissent des blooms récurrents de cyanobactéries, notamment l'été (Lehtimäki et al., 1997). Dans cet environnement peu salé, la présence de nodularine et sa bioaccumulation dans les poissons (Mazur-Marzec et al., 2007; Karjalainen et al., 2008; Stewart et al., 2012), moules (Mazur-Marzec et al., 2013) voire oiseaux marins (Sipiä et al., 2008) sont bien documentées. De la microcystine a même été détectée (Karlsson et al., 2005a) et son organisme producteur potentiel, *Anabaena* spp., identifié en mer Baltique (Halinen et al., 2007).

La présence de cyanobactéries toxiques voire de cyanotoxines a plusieurs fois été rapportée dans d'autres estuaires, notamment celui de San Francisco (Lehman et al., 2005; Lehman et al., 2013) mais l'origine semble être dulcicole. En effet, des études suggèrent que certains génotypes de *Microcystis* seraient tolérants à la salinité (Moisander et al., 2009) et des salinités supérieures entraîneraient une lyse et donc une libération de MC dans l'eau (Tonk et al., 2007), menant à une possible exposition pour les organismes aquatiques. Ainsi, (Preece et al., 2015) ont détecté de la microcystine par CL-SM dans des moules marines (*Mytilus trossulus*) exposées à des afflux d'eau d'un lac. D'autres cyanobactéries, dont certaines potentiellement toxiques, seraient aussi tolérantes à la salinité, à des degrés différents en fonction des espèces (tableau 32).

Ce phénomène d'apport de *Microcystis* toxiques en milieux estuariens semble être à l'origine des mortalités de loutres de mer observées en baie de Monterey, Californie (Miller et al., 2010). D'énormes quantités de MC ont été détectées (> 2000 mg/L) dans un lac relié à l'océan ayant probablement conduit à la contamination de mollusques marins dont la consommation, en raison de la détoxification qualifiée de lente (Amorim and Vasconcelos, 1999; Miller et al., 2010), constituerait un risque pour la santé des loutres mais également des consommateurs. En dehors de cet épisode d'intoxication (Gibble and Kudela, 2014) ont rapporté la persistance de faibles concentrations de microcystines à l'interface terre-mer dans cette même baie, suggérant un risque d'exposition chronique pour les organismes aquatiques. Surtout

que des études de contamination en conditions contrôlées ont montré que des moules marines (e.g. *Mytilus galloprovincialis*) pouvaient accumuler de la microcystine lorsqu'elles étaient exposées à des culutres ou des blooms de *Microcystis* sp. (tableau 32).

Tableau 32 : tolérances à la salinité rapportées pour certains genres de cyanobactéries. Tableau modifié à partir de Paerl et al. (2001).

	Genre/espèce	Limites de salinité pour la croissance (PSU)	Référence
Diazotrophe	<i>Anabaena aphanizomenoides</i> , <i>Anabaena torulosa</i>	0 – 15	Voir références dans Paerl et al. (2001)
	<i>Anabaenopsis</i>	0 – 20	
	<i>Aphanizomenon</i>	0 – 5	
	<i>Cylindrospermopsis</i>	0 – 4	
	<i>Nodularia</i>	5 – 30	
Non diazotrophe	<i>Microcystis</i>	0 – 2	Voir référence dans Paerl et al. (2001) Black et al., 2011 Orr et al., 2004a Tonk et al., 2007
	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	0 – 12,6*	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0 – 9,8	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0 – 10	
	<i>Oscillatoria</i>	0 – 30	Voir référence dans Paerl et al. (2001)

* toxicité affectée (i.e. moins de toxines quand salinité > 4,6)

En plus du transfert naturel de cyanotoxines de l'eau douce vers les estuaires, l'homme peut aussi « contaminer » l'environnement marin en effectuant des relargages d'eau de réservoirs contenant des cyanobactéries toxiques, comme cela a été rapporté au Japon (Takahashi et al., 2014; Umehara et al., 2015). Même si les toxines sont largement diluées par les marées, elles peuvent être temporairement biodisponibles pour les organismes aquatiques qui les accumulent (e.g. poissons, mollusques).

Cependant, certaines études sont en faveur de l'existence de cyanobactéries marines produisant des toxines. Notamment, des extraits de la cyanobactérie pélagique *Trichodesmium* (qui forme des blooms à la surface des eaux oligotrophes tropicales et subtropicales, (Capone et al., 1997)) ont révélé des effets toxiques par différents bioessais (Narayana et al., 2014) alors que dans un autre cas, un échantillon environnemental contenait de la palytoxine (i.e. généralement produite par le dinoflagellé benthique *Ostreopsis*) (Kerbrat et al., 2011).

Mais la plupart des espèces de cyanobactéries marines toxiques sont néanmoins benthiques. Ainsi, des cyanobactéries des genres *Geitlerinema* et *Oscillatoria*, retrouvées dans les biofilms à l'origine de la mortalité des coraux (phénomène de « Black Band Disease ») produisent de faibles concentrations de MC (Richardson et al., 2007; Stanic et al., 2011) même si leur implication dans ce phénomène a été

contestée (Glas et al., 2010). *Lyngbya majuscula*, fréquemment retrouvée dans les eaux tropicales (Taylor et al., 2014), produit de nombreuses molécules dont certaines ont été caractérisées toxiques, comme la lyngbyatoxine A ou la debromoaplysiatoxine, qui sont à l'origine de dermatites sévères observées fréquemment chez l'homme (Osborne et al., 2001). Il semblerait que des cyanobactéries benthiques de la famille des Oscillatoriaceae soient impliquées dans des intoxications caractérisées par différents symptômes dont certains correspondants à la ciguatera en Nouvelle-Calédonie (« CTX-like compounds ») (Laurent et al., 2008). L'identification de la neurotoxine homoanatoxine (Mejean et al., 2010) dans des extraits de *Hydrocoleum lyngbyaceum*, ainsi que dans des bénitiers prélevés en Nouvelle-Calédonie constitue un risque pour la santé humaine puisque des espèces de cette cyanobactérie sont largement présentes dans les régions tropicales et que les bénitiers y constituent une ressource alimentaire importante (Chinain et al., 2010). Ces bivalves pourraient être à l'origine d'un nouveau phénomène appelé « Ciguatera Shellfish Poisoning » (Roué et al., 2013) par opposition à la contamination classique par consommation de poissons (« Ciguatera Fish Poisoning »).

Un risque HSP (Hepatotoxic Seafood Poisoning) (Chen et al., 1993) lié à la consommation de mollusques contaminés par des cyanotoxines (notamment MC) d'origine marine a récemment été à nouveau évoqué par (Vareli et al., 2013). En effet, l'étude du potentiel toxique de différentes souches de cyanobactéries isolées sur les côtes du Portugal, notamment de *Synechococcus* et *Synechocystis* qui sont ubiquitaires dans les océans (Paerl, 2012), a révélé l'existence d'effets toxiques par différents bioessais (Martins et al., 2005; Martins et al., 2007; Costa et al., 2015). Bien que de faibles concentrations de MC obtenues par ELISA (pour certaines souches) et la présence d'un possible analogue des gonyautoxines (pour une souche de *Synechococcus*) aient été rapportées, les auteurs suggèrent que d'autres toxines pourraient être à l'origine des effets observés (Frazao et al., 2010).

Finalement, la présence de MC dans l'eau en Méditerranée (salinité > 30 ‰) et dans des moules en Grèce mais sans preuve d'apport par l'eau douce, a amené (Vareli et al., 2012) à suggérer l'implication des communautés cyanobactériennes marines (notamment *Synechococcus* et/ou *Synechocystis*) sans qu'un organisme producteur ne puisse être identifié.

Selon (Jakubowska and Szeląg-Wasielewska, 2015), la toxicité des picocyanobactéries a été négligée jusqu'à maintenant, malgré leur abondance dans de nombreux écosystèmes. Ils suggèrent donc qu'une attention particulière devrait leur être portée pour améliorer les connaissances sur leur toxicité et les risques qui y sont associés.

A ce jour, l'évaluation du risque « cyanotoxines » en milieu marin et notamment via la consommation de produits contaminés est à ses débuts (Mulvenna et al., 2012; Vareli et al., 2013), sans raison évidente selon Ibelings et al., 2014.

Objectifs et approche méthodologique

Suite à cette recherche bibliographique sur les origines possibles de la présence de cyanotoxines dans le milieu marin, nous avons voulu évaluer leur présence sur le littoral français métropolitain. Dans ce contexte, voici nos objectifs :

- optimiser une procédure d'extraction et d'analyse multi-cyanotoxines (*i.e.* classes majeures) sous forme libre, en se basant sur celle rapportée par Lajeunesse et al., 2012 (tableau 24)
 - définir le solvant d'extraction
 - caractériser ses performances (e.g. limites de détection et quantification, effets matrices)
 - voir figure 55 pour l'approche
- cribler les échantillons de mollusques du réseau de vigilance du REPHY (*cf.* chapitre 3)
 - pour évaluer la présence de ces toxines dans des espèces sentinelles marines (*i.e.* les moules sont connues pour accumuler toutes sortes de molécules dont les toxines de microalgues)
- cribler les périphytons collectés dans l'étang de Thau entre 2013 et 2014, dans lesquels nous avons détecté de la BMAA et son isomère le DAB (*cf.* chapitre 2)
 - Ce sont majoritairement des espèces benthiques de cyanobactéries qui seraient toxiques en milieu marin, et des toxines ont déjà été observées dans cette matrice (e.g. dans les Everglades)

La finalité étant de faire un état des lieux de la présence de cyanotoxines classiquement retrouvées en eau douce dans les eaux littorales françaises.

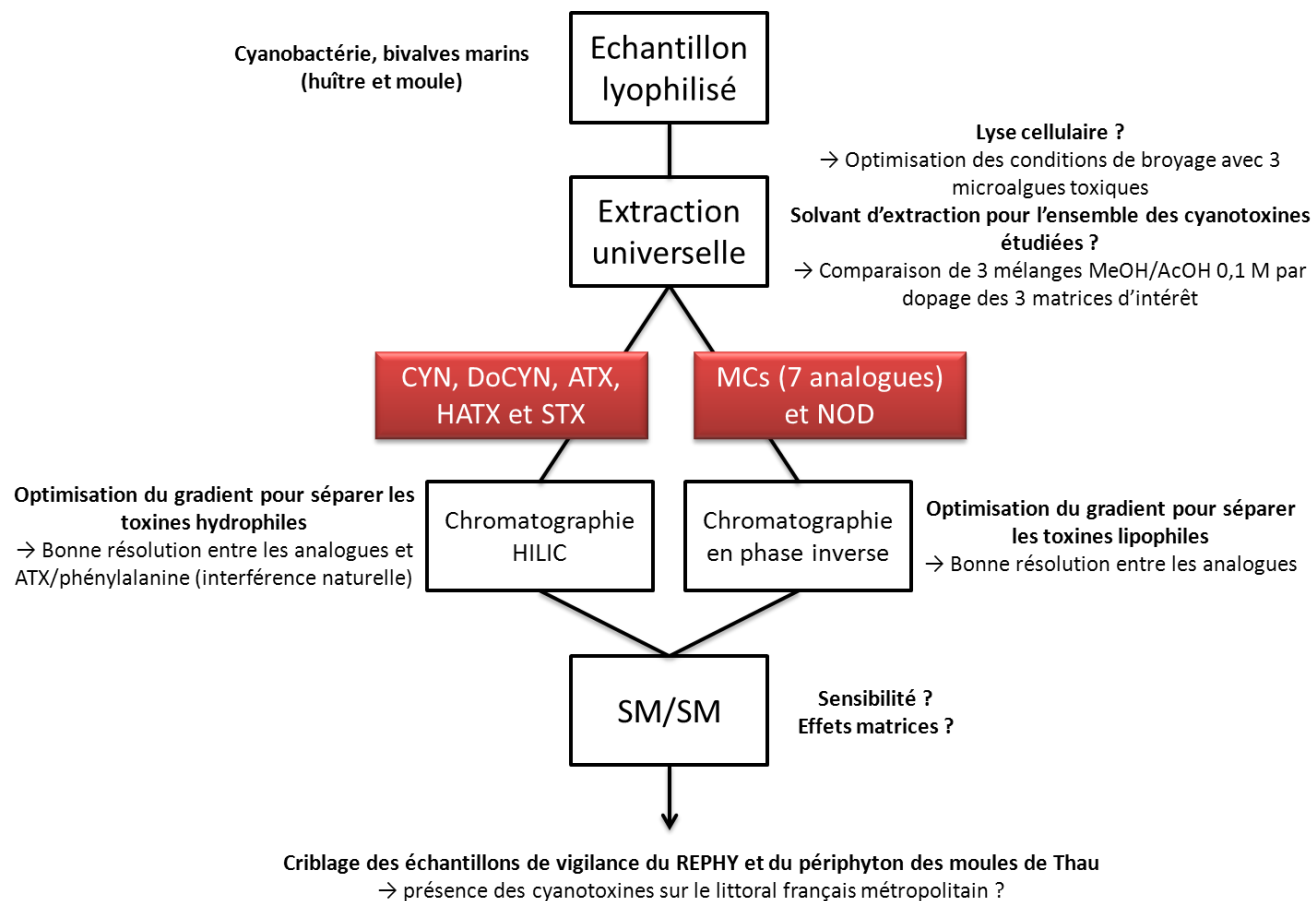


Figure 55 : approche méthodologique pour l'optimisation de la procédure d'analyse mutli-cyanotoxines par CL-SM/SM et l'analyse d'échantillons environnementaux.

Screening of marine mollusk and periphyton matrices using simultaneously two liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the target analysis of lipophilic and hydrophilic cyanotoxins

Damien Réveillon, Véronique Savar, Véronique Séchet, Philipp Hess, Zouher Amzil

Article en préparation, à soumettre dans Analytical Bioanalytical Chemistry

Résumé

Les toxines produites par les cyanobactéries constituent un problème sanitaire mondial majeur dans les eaux douces et dans certains écosystèmes saumâtres (e.g. la mer Baltique) alors que leur présence dans l'environnement marin a été ignorée pendant longtemps. Cependant, les cyanotoxines ont déjà été rapportées dans des organismes marins, le plus souvent à la suite d'un continuum eau douce-mer. Afin d'évaluer pour la première fois la présence éventuelle des cyanotoxines sur le littoral français métropolitain, nous avons développé deux méthodes multi-cyanotoxines pour identifier et quantifier 13 cyanotoxines principales, lipophiles et hydrophiles (microcystines, nodularine, cylindrospermopsine, anatoxine-a, saxitoxine et quelques analogues). Les méthodes analytiques incluent soit une chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) soit une chromatographie en phase inverse (RPLC), couplées à un spectromètre de masse triple quadripôle (CL-SM/SM). En effet, la CL-SM/SM est à la fois sélective et sensible et donc particulièrement adaptée à l'analyse des toxines dans les organismes marins. Les méthodes ont été caractérisées avec trois matrices (*i.e.* cyanobactérie, huître et moule). Tandis que d'excellentes performances ont été obtenues pour la méthode des cyanotoxines lipophiles, une étape de purification serait nécessaire pour réduire les effets matrices observés sur les toxines hydrophiles (*i.e.* suppression de signal pour toutes sauf la saxitoxine et décalage du temps de rétention pour toutes sauf la cylindrospermopsine et son analogue). Ces méthodes ont ensuite été appliquées à des échantillons environnementaux (*i.e.* mollusques et périphytons). Le criblage a montré l'absence des cyanotoxines recherchées dans les mollusques collectés mensuellement sur l'année 2013 dans neuf zones de production de coquillages réparties le long du littoral. Cependant, de la cylindrospermopsine et son analogue la désoxycylindrospermopsine ont été détectés dans certains périphytons collectés sur des coquilles de moules de l'étang de Thau entre 2013 et 2014. Rappelons que la méthode actuelle ne s'intéresse qu'aux cyanotoxines sous forme libre. A l'avenir, il serait donc

intéressant d'évaluer également la présence de microcystines sous forme liée dans les mollusques marins.

Abstract

Toxins produced by cyanobacteria represent a major issue in freshwater waterbodies worldwide and in some specific brackish environments (e.g. in the Baltic Sea) while their presence in marine ecosystems has been disregarded until recently. However, cyanotoxins have already been reported in marine organisms, most likely as a result of freshwater-marine transfer. To assess for the first time the potential presence of cyanotoxins in some French coastal waters, we have developed two multi-cyanotoxins methods to identify and quantify 13 major lipophilic and hydrophilic cyanotoxins (microcystins, nodularin, cylindrospermopsin, anatoxin-a, saxitoxin and some analogues). The analytical methods included hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and reverse phase liquid chromatography (RPLC) coupled to triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS). Indeed, LC-MS/MS is both selective and sensitive thus adapted for the analysis of toxins in marine complex matrices. The methods were characterized with three marine matrices (*i.e.* cyanobacteria, oyster and mussel). While excellent performance was obtained for the lipophilic toxins, implementation of a clean-up step would be required to reduce matrix effects the hydrophilic toxins (*i.e.* signal suppression for all but saxitoxin and shift in retention times except for cylindrospermopsin and its variant). These methods were then applied to mollusk and periphyton (*i.e.* biofilm collected from mussel shells) environmental samples. No targeted toxins were found in mollusks collected monthly in 2013 in nine shellfish production areas along the three French coasts. However, we have detected cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin in some periphyton samples collected in 2013 and 2014 from Thau lagoon, French Mediterranean Sea. Extensive future research should be performed on the presence of cyanotoxins in the marine environment, including the assessment of microcystins covalently bound to protein phosphatases.

Key words: cyanotoxins, LC-MS/MS, HILIC, mollusks, periphyton, matrix effects

1. Introduction

Cyanobacteria are well-known ubiquitous microorganisms that can proliferate rapidly to form blooms, scums or mats under favorable conditions in all waterbodies throughout the world (Codd et al., 2005). These excessive proliferations (known as harmful algal blooms or HABs) can be detrimental as they are often accompanied by noxious and/or toxic effects to ecological health and humans (Ibelings and Chorus, 2007; Paerl and Otten, 2013). Indeed, cyanobacteria produce a wide range of bioactive compounds, a major part being of non-ribosomal origin, including toxins (Kehr et al., 2011). Cyanotoxins are low molecular weight alkaloid and cyclic peptide compounds (*i.e.* between 165 and ca. 1100 Da) including hundreds of chemical molecules (over 100 analogues have been reported for only microcystins (Bortoli and Volmer, 2014)). They are divided into three main groups based on their mode of action; hepatotoxins [including microcystins (MC), nodularins (NOD) and cylindrospermopsins (CYN)]; neurotoxins [anatoxins (ATX) and paralytic shellfish toxins (PSTs) including saxitoxin (STX)] and dermatotoxins (e.g. lyngbyatoxins) (van Apeldoorn et al., 2007). However, CYN is now being recognized as a cytotoxin (Froscio et al., 2003; Humpage et al., 2005). No clear function of these toxins has been identified yet but their eco- and toxicological effects have been reviewed (Wiegand and Pflugmacher, 2005; van Apeldoorn et al., 2007; Holland and Kinnear, 2013). Cyanotoxins may bioaccumulate in aquatic organisms and be transferred through food chains, reaching organisms at higher trophic levels (Ibelings and Chorus, 2007; Smith et al., 2008a; Ferrao and Kozłowsky-Suzuki, 2011). As a result, numerous intoxications or death have been reported to date, mostly for animals but human poisoning cases are also documented (Falconer, 1999; Pitois et al., 2001; Backer et al., 2013). In humans, exposure to cyanotoxins can occur in various ways; however, the oral route is the most important, mainly through drinking water or by ingesting water during recreational activities. Therefore, the World Health Organization (WHO) has established a recommended drinking water value of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ and a recreational exposure guideline value of $10 \mu\text{g L}^{-1}$ for a specific analogue of microcystin (*i.e.* MC-LR) (Chorus and Bartram, 1999). Dermic exposure and inhalation are also possible (Backer et al., 2008). However, exposition via the consumption of contaminated foodstuff has gained increased attention since 2000's (Ibelings and Chorus, 2007; Mulvenna et al., 2012).

Most of the toxin-producing cyanobacterial genera are encountered in freshwater waterbodies (van Apeldoorn et al., 2007), except NOD produced specifically by *Nodularia spumigena* in brackish waters (e.g. the Baltic Sea). While cyanotoxins are considered as a serious threat in limnic ecosystems (Codd et al., 2005), the cyanotoxins-derived risk in the marine environment has emerged more recently (Laurent et al., 2008; Frazao et al., 2010; Vareli et al., 2013). Hitherto, only some marine cyanobacteria,

mainly benthic species (e.g. *Lyngbya majuscula*) have been reported as cyanotoxin-producers (Osborne et al., 2001; Mejean et al., 2010). Detection of MC in both the Mediterranean Sea and farmed mussels led Vareli and co-workers to hypothesize that some species belonging to the marine cyanobacterial community (e.g. ubiquitous *Synechococcus* spp. and/or *Synechocystis* spp.) produced the toxins; however no producing organism could have been identified yet (Vareli et al., 2012). Freshwater cyanobacteria and their toxins can also enter into the marine environment. Indeed, Gobble et al. reported the detection of persistent microcystin toxins at the land–sea interface in Monterey Bay, California (Gobble and Kudela, 2014). This freshwater-marine transfer of toxic *Microcystis* spp. may result in accumulation of MC in marine organisms and is suspected to be involved in death of sea otter (Miller et al., 2010). Therefore, cyanotoxins can be present in the marine environment, leading to deleterious effects for the consumers of contaminated foodstuffs.

A wide range of methods have been used for the analysis of cyanotoxins, including *in vivo* assays, *in vitro* bioassays based on the inhibition of eukaryotic protein phosphatases, immunoassays (ELISA) and chemical methods combining liquid chromatography with different detectors (e.g. ultraviolet, fluorescence, mass spectrometry) (reviewed by van Apeldoorn et al. (van Apeldoorn et al., 2007)). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) offers both selectivity and sensitivity and therefore seems to be the most appropriate method to perform a relatively fast and effective screening for cyanotoxins in complex marine matrices. Only few published methods which quantify both lipophilic and hydrophilic cyanotoxins in a single analysis were reported, either with RPLC columns (Hiller et al., 2007; Oehrle et al., 2010) or a HILIC column (Dell'Aversano et al., 2004). To avoid possible chromatographic issues (e.g. inappropriate retention or resolution), the development of two chromatographic methods, one for lipophilic and one for hydrophilic toxins has also been reported as a successful alternative by (Lajeunesse et al., 2012) for the screening of *Lyngbya wollei*, a freshwater benthic cyanobacteria.

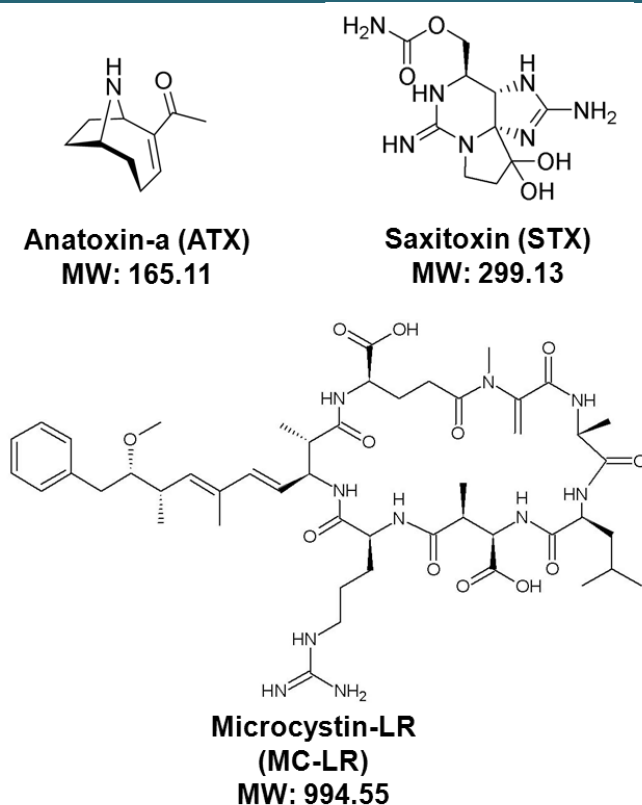


Figure 56: chemical structure and molecular weight of some studied cyanotoxins

To assess whether cyanotoxins were present in mollusks from some French coastal waters, we first optimized and characterized two methods for lipophilic and hydrophilic major classes of cyanotoxins (*i.e.* MCs, NOD, CYNs, ATXs and STX, figure 56) using different spiked matrices (*i.e.* cyanobacteria, oyster and mussel) and cyanotoxins-producing microalgae. Then, the methods were applied to screen 91 samples of mollusks (*i.e.* mussels and oysters) collected monthly in 2013 in nine production areas located on the three French coasts. In parallel, 14 periphyton samples (*i.e.* biofilms attached to mussels) collected in 2013 and 2014 from Thau lagoon, French Mediterranean Sea, were screened as cyanobacteria and cyanotoxins were reported in those matrices (e.g. in the Everglades or the Red Sea (Bellinger and Hagerthey, 2010; Mohamed and Al-Shehri, 2015)).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Certified standard solutions of cyanotoxins were purchased from National Research Council Canada (NRCC, Halifax, Canada) for cylindrospermopsin (CYN, $30 \pm 2 \mu\text{M}$ in purified water), anatoxin-a (ATX, $30 \pm 1.1 \mu\text{M}$ in methanol/water (9:91, v/v) with 0.01% acetic acid), and saxitoxin dihydrochloride

(STX, $66.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ in 3 mM hydrochloric acid) while microcystin-LA (MC-LA), -LF, -LR, -LW, -LY, -RR, and -YR, Nodularin (NOD), deoxy-cylindrospermopsin (DoCYN) and homoanatoxin-a (HATX) were from Novakits, France (purity $\geq 95\%$, in methanol for all except HATX in 0.1% trifluoroacetic acid). DL-Phenylalanine (purity $\geq 99\%$) was purchased from Acros Organic (Fisher Scientific).

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained as HPLC grade solvents from JT Baker. Water for analysis was supplied by a Milli-Q integral 3 system (Millipore, France). Solutions of reagent grade acetic acid (AcOH), ammonium formate and formic acid were from Sigma-Aldrich, France.

2.2 Samples

2.2.1 Microalgal samples

The two cyanobacterial and one dinoflagellate strains available for this study were *Oscillatoria* sp. (PCC 9029, putatively DoCYN, CYN, ATX and HATX-producer), *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806, MC-LR producer) and *Alexandrium minutum* AM99PZ (STX-producer). They were grown in batch cultures using BG11, modified BG11 (with 6 mM NaNO_3 , supplemented with 10 mM NaHCO_3) and modified L1 (salinity adjusted to 27‰) media, respectively (Stanier et al., 1971; Guillard and Hargraves, 1993). *Oscillatoria* sp. and *M. aeruginosa* were maintained at 22 °C under a 16:8 h light/dark cycle at a light intensity of $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (17 °C and $115 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ for *A. minutum*).

Freeze-dried material of these strains was used to determine optimal conditions for the simultaneous extraction of different classes of cyanotoxins (*i.e.* optimization of cell breakage). Moreover, they were analyzed to assess the efficiency of both analytical methods to detect some hydrophilic and lipophilic cyanotoxins in real samples (*i.e.* non spiked).

2.2.2 Mollusk and periphyton samples

Sampling of bivalves was made within the vigilance program (figure 57), as part of the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network program (REPHY). This program was established for the monitoring of novel or emerging toxins, *i.e.* analysis by both LC-MS/MS and the lipophilic mouse bioassay as a screen. In this context, nine sentinel sites were chosen for geographical spread and to reflect important French shellfish production areas. Digestive gland tissues (DG) of either oysters (*Crassostrea gigas* in Ronce and Parc Leucate) or mussels (*Mytilus galloprovincialis* in Etang de Diana and *M. edulis* in all other sites) were collected once a month on each site in 2013, homogenized and stored at -80 °C until lyophilization. In total, 91 samples were available for the screening of cyanotoxins.

Periphyton samples were obtained from a previous study on the putative neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) (Réveillon et al., 2015). Fourteen of these samples collected from Thau lagoon (figure 57) between July 2013 and October 2014 were screened.



Figure 57: map of French coastline with the sites of sampling for mollusk and periphyton samples.

2.3 Extraction procedure

First, the amounts of glass beads (250 or 500 mg) and the type of Eppendorf tube (1.5 or 2 mL) were tested with the three toxigenic microalgae. Then, according to Hiller et al. three methanol – 0.1 M acetic acid mixtures were compared (MeOH/0.1 M AcOH), with 25, 50 and 75% of MeOH (Hiller et al., 2007). In the absence of naturally contaminated or producing marine organisms, recoveries were defined by spiking the three types of matrices used to characterize the methods (see paragraph 3.4.5). The conditions yielding in the highest toxin recoveries were applied to all samples. Finally, 1 mL of MeOH/0.1M AcOH (75:25, v/v) mixture was added to 15 mg of freeze-dried material previously weighted

in a 1.5 mL safe-lock Eppendorf® tube. Then, 500 mg of glass beads (200 µm diameter) were added before grinding in a mixer mill (Retsch MM400, Germany) for 30 min. Tubes were centrifuged at 13 000 *g* to precipitate beads and debris then 500 µL of supernatant were collected and filtered through a 0.22-µm filter (Nanosep® MF, Mexico) to remove particulate material.

2.4 Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

The analytical system included ultra-pressure liquid chromatography (UPLC) coupled with tandem mass spectrometry. The UPLC system (Shimadzu, Japan), consisted of two pumps (LC-30AD), an autoinjector (SIL- 30AC) with a refrigerated rack maintained at 4 °C, degassers (DGU-20A), a column oven set at 25 °C (CTO-20AC) and a system controller (CBM-20A). The MS/MS analyses were performed with an API 5500 QTRAP triple-quadrupole mass spectrometer (AB Sciex, France) in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) detection. Solutions of individual cyanotoxins were directly infused in the mass spectrometer to obtain the best MS-parameters (compound- and source-dependent). Fragmentation spectra allowed us to choose one quantitative (*i.e.* most intense product ion except when background signal was high for this transition) and two qualitative transitions for each molecule. Toxins were unambiguously distinguished thanks to chromatographic resolution, specific mass spectral transitions and quantitative to qualitative ion ratios. Quantitation was performed relatively to certified or pure standards of cyanotoxins. The software Analyst 1.5.1® was used to analyze acquired raw data. To cope with the different polarities of all molecules, we have developed two distinct analytical methods.

2.4.1 Lipophilic cyanotoxins

The lipophilic group of cyanotoxins (7 MCs analogs and NOD) was separated on a Kinetex XB-C18 column (100 x 2.10 mm; 2.6 µm, Phenomenex®). Mobile phases were Milli-Q water (mobile phase A) and ACN (mobile phase B), both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The flow rate was 0.3 mL.min⁻¹, and the injection volume was 5 µL. The gradient elution started with 30% of mobile phase B, rising to 80% over 5 min, held for 1 min, then decreased to 30% over 0.5 min and held for 4 min to equilibrate the system. The electrospray ionization (ESI) interface was operated using the following parameters: curtain gas 25 psi; temperature 500 °C; gas1 30 psi; gas2 70 psi; ion spray voltage 5500 V. For detection, the parameters are reported in Table 33.

Table 33: optimized LC-MS/MS conditions and retention times for the lipophilic cyanotoxins.

Toxin	Rt (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
MC-RR	2.09	520	135*	76	45	6
			213		49	12
			200		45	12
NOD	2.67	826	227*	151	69	12
			163		67	14
			135		83	6
MC-YR	2.99	1046	213*	221	87	12
			375		71	22
			135		105	22
MC-LR	3.10	996	213*	186	85	14
			375		70	22
			135		105	6
MC-LA	4.30	911	375*	81	45	8
			135		91	6
			213		67	20
MC-LY	4.47	1003	135*	106	93	6
			375		49	8
			213		71	12
MC-LW	5.01	1026	135*	106	103	12
			375		53	22
			213		83	12
MC-LF	5.14	987	375*	96	47	8
			135		93	6
			213		75	12

Rt: retention time; DP: declustering potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential ;*quantitative ion

2.4.2 Hydrophilic cyanotoxins

The hydrophilic group of cyanotoxins was separated on a TSK gel Amide-80 column (150 x 2.0 mm; 3 μ m, TOSOH Science®). Mobile phases were Milli-Q water (mobile phase A) and ACN (mobile phase B), both containing 0.1% acetic acid. The flow rate was 0.3 mL.min⁻¹, and the injection volume was 5 μ L. The gradient elution started with 10% of mobile phase A, rising to 55% over 7 min and rising again to 100% over 0.5 min, held for 3.5 min, then decreased to 10% over 1 min and held for 5 min to equilibrate the system. The ESI interface was operated using the following parameters: curtain gas 25 psi; temperature 500 °C; gas1 30 psi; gas2 70 psi; ion spray voltage 5500 V. For detection, the parameters are reported in Table 34.

Table 34: optimized LC-MS/MS conditions and retention times for the hydrophilic cyanotoxins.

Toxin	Rt (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
DoCYN	5.41	400	194*		39	4
			176	106	51	10
			274		29	14
Phe	5.67	166	91*		29	4
			104	176	37	12
			121		19	8
CYN	5.72	416	194*		33	16
			176	106	33	10
			336		51	20
HATX	7.15	180	163*		19	10
			57	171	25	12
			106		23	12
ATX	7.72	166	131*		25	10
			149	61	21	6
			43		55	6
STX	11.1	300	300*		27	46
			221	96	21	18
			204		31	54

Rt: retention time; DP: declustering potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential ;*quantitative ion

2.5 Method characterization

For the characterization of analytical methods, freeze-dried material of three types of matrices were used. The marine cyanobacteria *Nostoc* sp. CCMP 2511 grown in batch culture using modified L1 medium (*i.e.* with three times the classic NaNO_3 concentration, (Guillard and Hargraves, 1993)) was used as a 'phytoplankton' matrix. Oyster (*Crassostrea gigas*) collected in 2009 from Thau lagoon, French Mediterranean Sea and mussel (*Mytilus edulis*) collected in 2014 from Pen Bé, Atlantic Ocean, were used as 'mollusk' matrices.

Limits of quantification (LOQs), matrix effects and total recoveries of the methods were estimated with these 3 matrices. For LOQs and matrix effects, matrices were spiked with all toxins after extraction in MeOH/0.1M AcOH (75:25, v/v). The LOQs corresponded to the lowest concentration of pure standards in spiked matrices giving a signal-to-noise ratio ($S/N \geq 10$). For determining matrix effects, areas of standards spiked in the matrices (concentrations at ca. 100 times the LOQs for all toxins but DoCYN, CYN, ATX and HATX, *i.e.* 1000 times the LOQs) were compared to areas of standards prepared directly in the extraction solvent. The signal suppression or enhancement was expressed in percentage (*i.e.* < 100% indicates signal suppression and > 100% signal enhancement). For recoveries, matrices were spiked (concentrations at ca. 150 times the LOQs) with all toxins but DoCYN and HATX (*i.e.* due to lack of

standard solutions) before extraction and the yield was obtained by comparing the peak areas between the spiked matrix and the spiking solution mixture.

3. Results and discussion

3.1 Sample preparation

Except CYN that can be found in high concentration in extracellular medium (Norris et al., 2001), all other cyanotoxins are intracellular metabolites. Thus, the release of cyanotoxins from microalgae and other matrices requires an appropriate breaking of cells. Our procedure was developed based on previous studies that used a mixer mill to satisfactorily extract metabolites (*i.e.* pigments and toxins) from microalgae (Serive et al., 2012; Réveillon et al., 2014). The significantly lower STX recoveries with the 2 mL tube suggested a less efficient breaking of cells in these conditions (figure 59 supplementary material). Therefore, 500 mg of glass beads and the 1.5 mL Eppendorf® tube constituted the best compromise.

As cyanotoxins display a wide range of polarity, their simultaneous extraction with a single solvent is challenging. Hence, recoveries of selected analytes were compared with three methanol/acetic acid mixtures based on Hiller et al. (Hiller et al., 2007) but using different marine matrices (*i.e.* phytoplankton, oyster and mussel). The seven toxins showed striking differences in term of recoveries, depending more on the extraction solvent mixture than the matrices (figure 60 supplementary material). While, as expected, hydrophobic molecules (MCs and NOD) were more soluble in the mixture with the highest organic content, the opposite trend was observed for all polar toxins except STX. Independently of the solvent, recoveries for CYN and to a lesser extent for ATX in mollusk matrices were abnormally low (< 6 and 27%, for CYN and ATX respectively). These observations, in addition to recovery > 100% for STX suggest that uncontrolled factors may be involved (*i.e.* matrix effects). In our case, the MeOH/AcOH (75:25, v/v) mixture was used for all further sample extractions while the mixture with 50% MeOH had been chosen by (Hiller et al., 2007).

3.2 Optimization of the hydrophilic and lipophilic LC-MS/MS methods

We first tried to develop a unique chromatographic method allowing for faster separation of all studied cyanotoxins, as previous published methods (e.g. (Hiller et al., 2007; Oehrle et al., 2010)). As unsatisfactory results were obtained (*i.e.* poor/no retention and resolution of polar analytes) we decided to optimize and characterize two methods for lipophilic and hydrophilic toxins (*i.e.* RPLC vs. HILIC). This

strategy reported by Lajeunesse and co-workers (Lajeunesse et al., 2012) was employed here using marine matrices (*i.e.* cyanobacteria, oyster and mussel) and more cyanotoxins. Indeed, selectivity between HILIC and RPLC columns differs significantly, thus their use in conjunction may give the best results according to (Yoshida, 2004). The Kinetex XB-C18 column was chosen for lipophilic cyanotoxins after the successful development of a multi-toxins method for lipophilic phycotoxins in our laboratory (Zendong et al., in press) while TSK gel Amide-80 has extensively been used for the separation of polar PSTs and cyanotoxins (Dell'Aversano et al., 2004; Foss et al., 2012; Lajeunesse et al., 2012).

Gradients were optimized as a compromise between chromatographic separation, peak shapes and time of analysis. Except CYN and Phe, all molecules were satisfactorily resolved, notably ATX and its natural isobaric interference phenylalanine (Furey et al., 2005), hence reducing misidentification (figure 58).

Elution order of lipophilic molecules was as classically reported with RPLC column (e.g. (Neffling et al., 2009; Oehrle et al., 2010)). However, in our conditions, CYNs eluted before ATXs which is opposite to previous studies using TSK gel Amide-80 column (Dell'Aversano et al., 2004; Lajeunesse et al., 2012). It may result from the fact that we did not use ammonium buffer in the mobile phases. Indeed, Lajeunesse et al. mentioned that the order of elution for hydrophilic toxins is affected by ammonium acetate concentrations and that it is difficult to predict the eluted order of polar toxins (Lajeunesse et al., 2012).

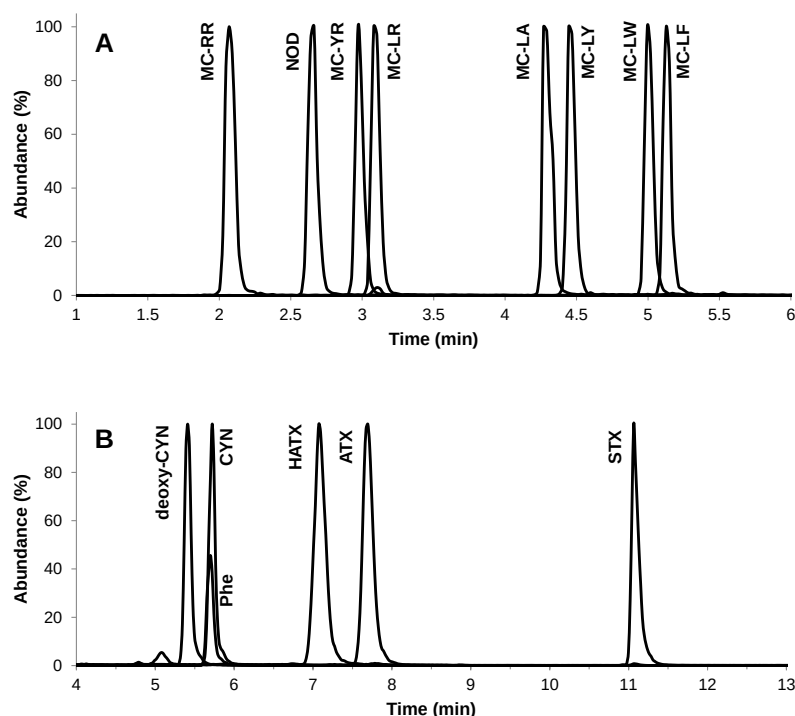


Figure 58: extracted ion chromatograms (*i.e.* only quantitative transitions were used) of standard solutions of (A) lipophilic and (B) hydrophilic cyanotoxins separated by RPLC and HILIC column, respectively.

Finally, the two methods allowed for appropriate separation of major classes of cyanotoxins in less than 11 and 17 min (*i.e.* total duration between two injections) for lipophilic and hydrophilic molecules, respectively. This is twice faster than Lajeunesse et al. who also used two methods (Lajeunesse et al., 2012) but ca. twice longer than Oehrle et al. who used a single UPLC method (Oehrle et al., 2010) for the quantification of priority cyanotoxins in natural waters.

3.3 Characterization of the hydrophilic and lipophilic LC-MS/MS methods

The health risk assessment of cyanotoxins requires reliable and sensitive analytical methods to test complex marine matrices that represent potential foodstuff (e.g. mussel and oyster). Limits of quantification for the studied cyanotoxins were between 0.25 and 3.6 pg on column for all toxins but saxitoxin (*i.e.* 47 pg) and the corresponding LOQs in matrices ranged from 0.05 for NOD to 6.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW for STX (table 35). Previous studies with similar toxins reported instrument sensitivity between 0.4 – 6, 1.5 – 3 and 25 – 50 pg on column (Oehrle et al., 2010; Chen et al., 2012; Rodriguez et al., 2014), thus our LC-MS/MS methods are highly sensitive. There are no LOQs in mollusk matrices expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ DW for multi-cyanotoxins methods in the bibliography; therefore we cannot compare our results. However, estimations that we made from LOQs reported in pg on column by Lajeunesse et al. (2012) in cyanobacteria (*i.e.* *Lyngbya wollei*) for six cyanotoxins were comparable to ours (*i.e.* between 0.01 for NOD and 2.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW for STX). Here the order of sensitivity for the LOQs in the matrix was mussel (*i.e.* highest sensitivity) > cyanobacteria > oyster which is surprising as mollusks are assumed to be more complex matrices than cyanobacteria.

Table 35: limit of quantification ($S/N \geq 10$) for each toxin, on column (pg, injection volume 5 μL) and in the matrix ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)

Toxin	LOQ (pg on column)	LOQ (matrix, $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)*	Toxin	LOQ (pg on column)	LOQ (matrix, $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)*
MC-RR	0.40	0.21 – 0.23	MC-LF	0.25	0.06 – 0.13
NOD	0.25	0.05 – 0.10	DoCYN	0.3	0.67 – 1.7
MC-YR	0.95	0.24 – 0.54	CYN	0.4	0.34 – 0.67
MC-LR	1.3	0.33 – 0.36	HATX	3.3	0.37 – 0.93
MC-LA	0.25	0.05 – 0.12	ATX	3.6	0.03 – 0.17
MC-LY	0.25	0.07 – 0.14	STX	47	6.6 – 6.7
MC-LW	0.50	0.09 – 0.10			

* minimal and maximal LOQs for the three matrices.

While being highly selective and sensitive, LC-ESI/MS/MS methods are susceptible to matrix effects. This phenomenon may originate from co-eluting matrix components that affect ionization of the analytes of interest, resulting either in ion enhancement or more frequently in ion suppression (Matuszewski et al., 2003).

Total recoveries and matrix effects were similar (table 36). Thus, the strong matrix effects explained the low recoveries for CYNs and ATXs as these toxins showed high signal suppression (≥ 93 and 34%, respectively). For all other toxins, matrix effects were acceptable despite a weak signal enhancement for STX. Matrix effects have not been extensively studied for cyanotoxins. Lajeunesse et al. observed a mean signal suppression of 36% for both hydrophilic and lipophilic, ranging from 17% for MC-RR to 86% for CYN in *Lyngbya wollei* cyanobacteria (Lajeunesse et al., 2012), ca. of similar significance as matrix effects observed with our analytical methods (except for STX for which signal enhancement occurred in our case).

Table 36: total recoveries and matrix effects (% , $\pm$ SD) of studied cyanotoxins obtained by spiking the three matrices in triplicate, either before or after extraction. For matrix effects, results $\leq 100\%$ corresponded to signal suppression while $\geq 100\%$ to signal enhancement.

Toxin	Matrix effects (mean $\pm$ SD, %)			Total recoveries (mean $\pm$ SD, %)		
	Cyanobacteria	Oyster	Mussel	Cyanobacteria	Oyster	Mussel
MC-RR	99 $\pm$ 7.2	106 $\pm$ 3.7	102 $\pm$ 4.0	102 $\pm$ 1.6	113 $\pm$ 0.9	105 $\pm$ 2.1
NOD	99 $\pm$ 3.3	107 $\pm$ 7.0	98 $\pm$ 5.3	97 $\pm$ 5.3	103 $\pm$ 4.1	91 $\pm$ 3.1
MC-YR	90 $\pm$ 6.4	102 $\pm$ 3.7	94 $\pm$ 4.9	91 $\pm$ 1.2	98 $\pm$ 1.5	92 $\pm$ 2.2
MC-LR	95 $\pm$ 4.5	103 $\pm$ 2.6	101 $\pm$ 3.8	100 $\pm$ 2.9	104 $\pm$ 4.0	96 $\pm$ 3.5
MC-LA	89 $\pm$ 1.6	100 $\pm$ 4.3	94 $\pm$ 6.9	102 $\pm$ 3.2	105 $\pm$ 4.3	100 $\pm$ 2
MC-LY	92 $\pm$ 7.9	94 $\pm$ 0.6	95 $\pm$ 1.6	99 $\pm$ 2.1	101 $\pm$ 3.2	96 $\pm$ 4.3
MC-LW	103 $\pm$ 3.7	100 $\pm$ 5.2	102 $\pm$ 1.8	94 $\pm$ 4.3	88 $\pm$ 1	83 $\pm$ 5.8
MC-LF	85 $\pm$ 0.5	89 $\pm$ 3.5	93 $\pm$ 3.2	93 $\pm$ 4.0	89 $\pm$ 6.7	83 $\pm$ 1.1
DoCYN	2.2 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.9	*	*	*
CYN	3.1 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.05	2.5 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.3
HATX	66 $\pm$ 1.0	49 $\pm$ 0.5	42 $\pm$ 1.4	*	*	*
ATX	39 $\pm$ 1.8	22 $\pm$ 0.7	26 $\pm$ 1.8	34 $\pm$ 0.3	28 $\pm$ 1.2	27 $\pm$ 1.1
STX	114 $\pm$ 1.4	117 $\pm$ 3.6	119 $\pm$ 1.9	95 $\pm$ 5	87 $\pm$ 1.9	105 $\pm$ 4

* Not assessed as standard solutions were lacking

A matrix effect on retention times was also observed for ATX, HATX and STX. Indeed, these toxins in spiked matrices eluted 3.5, 2.9 and ca. 1.1 min before the standards in the extraction solvent (corresponding to a 45, 40 and 10% difference) (table 37, supplementary material). A similar observation was reported by McCarron et al. using a TSK gel Amide-80 column (McCarron et al., 2014). They acknowledged that HILIC-MS/MS analysis of BMAA and isomers (*i.e.* polar non proteinogenic amino acids) was complicated by the effect of matrix on retention time and that issue should be overcome with an SPE cleanup. However, in this study, the shift was repeatable and molecules can still be unambiguously identified thanks to specific product ions and ion ratios.

As mentioned by Van De Steene et al., labeled internal standards are the best way to cope with matrix effects (Van De Steene et al., 2006). Unfortunately, as only few are available (e.g. ^{15}N -STX), SPE cleanup would be a valuable alternative. As for the extraction solvent, dealing with the diversity of cyanotoxins is difficult. Indeed, Chen et al. observed unsuitable recoveries for CYN, ATX and NOD when performing C18 SPE cleanup on a mixture of 12 toxins (Chen et al., 2012). Here, a SPE cleanup for only the polar toxins could be implemented as low matrix effects (*i.e.* both on retention time and signal suppression) were observed for MCs. For this purpose, graphitized carbon SPE cleanup was reported as suitable for the extraction of CYN (Norris et al., 2001) and PSTs from shellfish (Boundy et al., 2015). Notably, Guzmán-Guillén et al. reported excellent CYN recoveries from cyanobacteria and fish tissues using a SPE clean-up strategy with a porous graphitic carbon column (Guzman-Guillen et al., 2012; Guzmán-Guillén et al., 2015).

3.4 Application of hydrophilic and lipophilic methods to samples

3.4.1 Toxigenic microalgae

Three putatively toxigenic microalgae were used to test the capacity of the two developed methods to detect toxins in real samples. We were able to quantify all the expected toxins. Indeed, about 40, 15, 1.2 and 0.26 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW were found in *Oscillatoria* sp. PCC 9029 for HATX, CYN, ATX and DoCYN, respectively. These results are qualitatively and quantitatively in agreement with previous studies (Araoz et al., 2005; Mazmouz et al., 2010). Furthermore, MC-LR (ca. 1200 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) and STX (ca. 1800 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) were observed in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 and *Alexandrium minutum* AM99PZ, respectively.

Following these findings, the multi-toxin methods proved to be useful for the analysis of various microalgae samples using either the RPLC or the HILIC column and were thus applied to environmental marine samples.

3.4.2 Marine periphyton and mollusk matrices

For the monitoring of microalgal toxins within the vigilance program of REPHY, mollusks were chosen as they represent sentinel species, *i.e.* they are sessile filter-feeding organisms that can accumulate high amounts of toxins produced by phytoplankton, mainly in digestive glands (Vasconcelos, 1995; Bricelj and Shumway, 1998).

While neither lipophilic nor hydrophilic toxins were detected in mollusk digestive glands, CYN and DoCYN were detected in 13 out of the 14 periphyton samples collected from Thau lagoon. Identification was confirmed based on retention time, product ions and quantitative to qualitative ion ratios (1.51 and 2.27 for the standards vs. 1.54 and 2.41 in the periphyton matrix, for DoCYN and CYN respectively) (figure 59). The concentrations ranged from <LOQ (*i.e.* $0.67 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$) to $1.5 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$. It should be noted that this amount of CYN may be just a portion of what is really in the samples as strong signal suppression were observed for CYN and DoCYN during the method characterization.

Unfortunately, identification of organisms composing periphyton complex matrices was not performed, thus the putative CYN-producing organism(s) cannot be identified. In other studies, cyanobacteria and diatoms were found to dominate periphyton communities (Nayar et al., 2003; Romagnoli et al., 2007). Indeed, six cyanotoxins (e.g. saxitoxin, microcystin and anatoxin-a) have already been detected in periphyton from the Everglades (Bellinger and Hagerthey, 2010), while MCs and STX have been found in 7 out of the 9 cyanobacterial strains isolated from biofilms in a mangrove of the Red Sea (Mohamed and Al-Shehri, 2015). These results raised questions about potential transfer of cyanotoxins in Thau lagoon food web as periphyton can be consumed by grazer fauna (e.g. zooplankton) (Hillebrand et al., 2002).

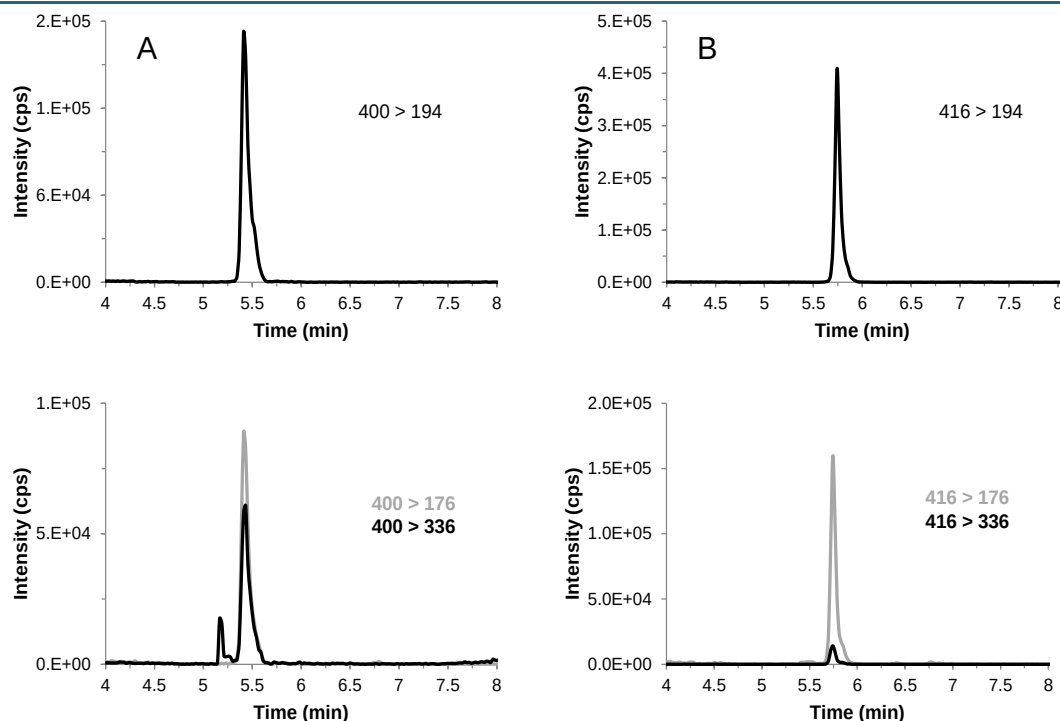


Figure 59: extracted ion chromatograms of (A) DoCYN and (B) CYN detected in the periphyton sample collected on May 5, 2014 from mussels of Thau lagoon. Identity was confirmed by correct retention time, product ions and ion ratios.

The non-detection of cyanotoxins in mollusks (*i.e.* LOQ between 0.05 and 6.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) with the current methods does not guarantee that there is no cyanotoxins in these shellfish. Indeed, it has been reported that some MC congeners can form covalent bonds to protein phosphatases (*i.e.* their cellular target (Robinson et al., 1991)) hence total extraction of MC from mollusk matrices would require an additional treatment (*i.e.* Lemieux oxidation (Sano et al., 1992)). Williams et al. reported that only 0.1% of total MC was found as a free form in *Mytilus edulis* contaminated by toxic *Microcystis aeruginosa* (Williams et al., 1997) indicating that total MC concentration can be largely underestimated by classic extraction methods. Despite being laborious (Neffling et al., 2010; Cadel-Six et al., 2014), this oxidation giving the unique marker 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid (MMPB) should be optimized in future studies to improve the procedure for the screening of marine mollusk matrices (*i.e.* free and total microcystins).

Moreover, samples were screened by target MS/MS (*i.e.* MRM detection for the 13 standards used). Despite being sensitive, target analyses are restricted to the number of available standards. Their application may be limited for screenings as hundreds of cyanotoxins are known while new analogues or new toxic compounds (*i.e.* not defined as “cyanotoxins” yet) are frequently reported (Frazao et al., 2010; Costa et al., 2015; Qi et al., 2015). To partially fill this gap, non-targeted analyses based on high resolution mass spectrometry (HRMS) and confrontation to database (in-house or openly accessible)

seems a promising tool for the screening of toxins produced by microalgae (Lajeunesse et al., 2012; Li et al., 2013; Schymanski et al., 2015), including cyanotoxins in marine organisms.

4. Conclusion

Two multi-cyanotoxins methods have been developed and characterized for the screening of major groups of lipophilic and hydrophilic cyanotoxins (*i.e.* hepatotoxins, and neurotoxins) in marine organisms. Different conditions of extraction were tested (*i.e.* cell breakage and solvent extraction) to cope with the different polarities of the studied cyanotoxins. While the method for lipophilic cyanotoxins was robust (*i.e.* good recovery and high sensitivity, low matrix effects), the analysis of hydrophilic cyanotoxins should be further improved as strong matrix effects were observed (*i.e.* signal suppression for CYNs and ATXs and a shift in retention time for ATXs and STX, although repeatable). To overcome these issues, a SPE cleanup step should be assessed in future works (e.g. porous graphitic carbon cartridge). The analysis of environmental samples with the two developed methods led to the detection of CYN and DoCYN in periphyton samples collected from mussels of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. However, no studied cyanotoxins were detected in marine mollusks despite the screening of ca. 100 samples collected monthly in 2013 from nine different shellfish productions areas along the three French coasts. While being highly sensitive, our MS/MS analysis cannot exclude that untargeted cyanotoxins were present in the analyzed samples. In comparison to the freshwater environment, the assessment of a cyanotoxin-derived risk in the marine environment is just in early stages. These results evidence the need for further investigation into the presence of cyanotoxins (including microcystins bound to proteins) in marine ecosystems such as Thau lagoon, first to determine putative cyanotoxin-producing organisms and to assess the risk of transfer in food webs, including foodstuffs like shellfish.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out under the RISALTOX project (Ifremer) and co-funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. The authors would like to thank all of the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study. They also would like to thank the members of Ifremer involved in the French phytoplankton and phycotoxins monitoring network (REPHY).

5. Supplementary Material

Figure 60: Relative extraction recoveries obtained with 2 mL tube and 250 mg (white bars) or 500 mg (light grey bars) glass beads or 1.5 mL tube and 250 mg (dark grey bars) or 500 mg (black bars) glass beads. Results were expressed relatively to peak areas obtained with the selected conditions, *i.e.* 500 mg of beads and the 1.5 mL tube.

Figure 61: Recoveries for (A) *Nostoc* sp. CCMP 2511, (B) oyster and (C) mussel matrices spiked before extraction with the three different methanol – 0.1 M acetic acid mixtures (MeOH 25%/0.1M AcOH (white bars), MeOH 50%/0.1 M AcOH (grey bars) and MeOH 75%/0.1 M AcOH (black bars)). Results are expressed relatively to recovery obtained with the selected extraction solvent (*i.e.* MeOH 75%/0.1 M AcOH). The high differences of recoveries for CYN and ATX in *Nostoc* sp. are exacerbated by the fact the low recoveries were obtained.

Table 37: matrix effects on retention times for CYN, ATX, HATX and STX, expressed as a shift (min) between the standards spiked in the matrices and the pure standards (mean $\pm$ SD).

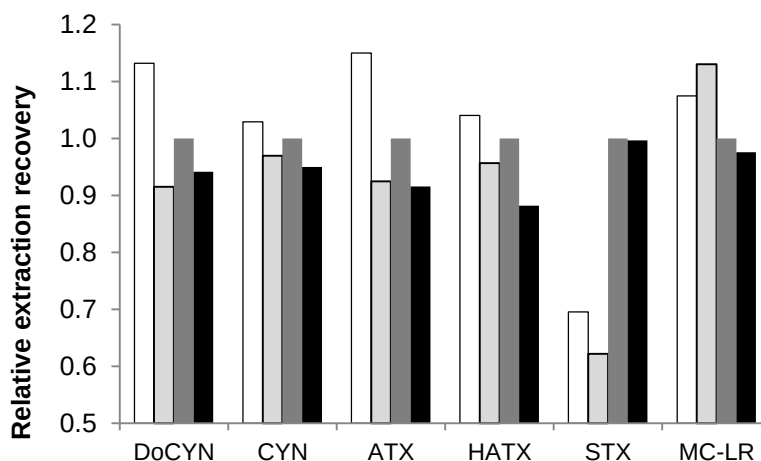


Figure 60: relative extraction recoveries obtained with 2 mL tube and 250 mg (white bars) or 500 mg (light grey bars) glass beads or 1.5 mL tube and 250 mg (dark grey bars) or 500 mg (black bars) glass beads. Results were expressed relatively to peak areas obtained with the selected conditions, *i.e.* 500 mg of beads and the 1.5 mL tube.

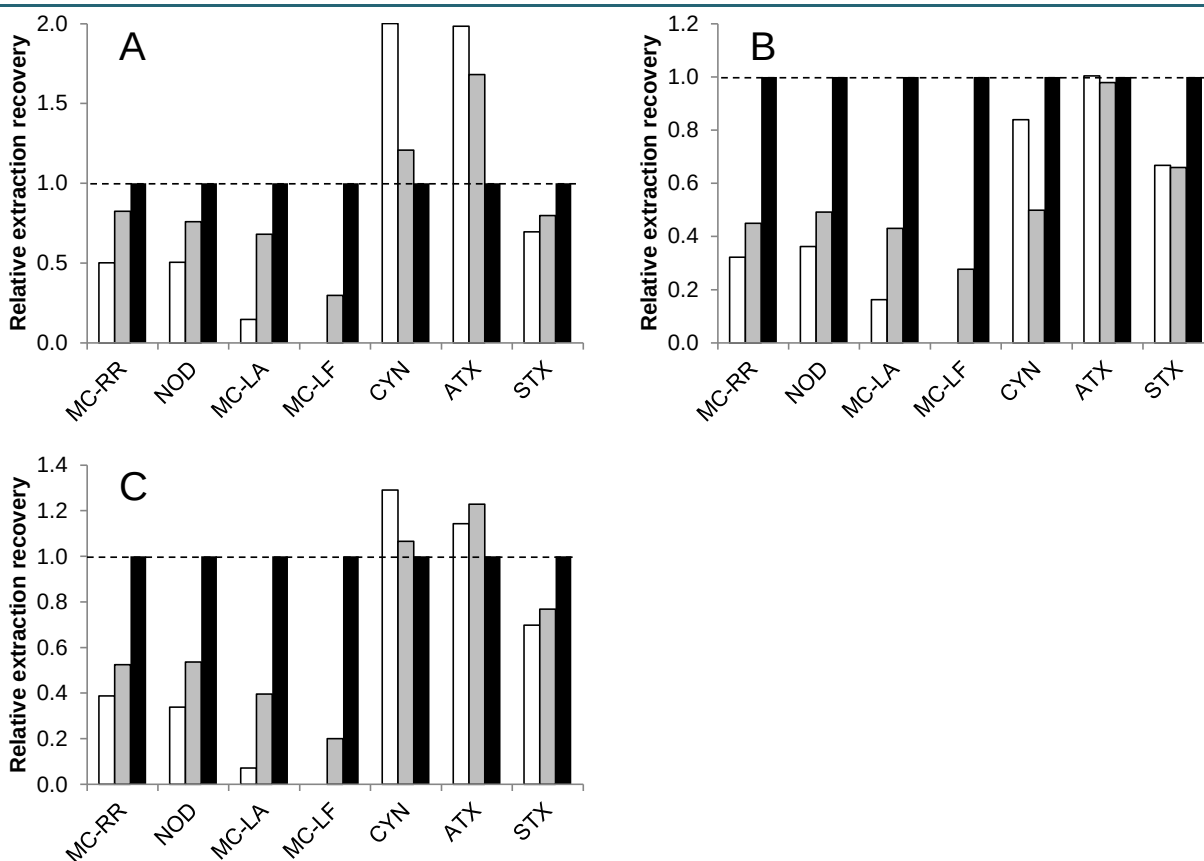
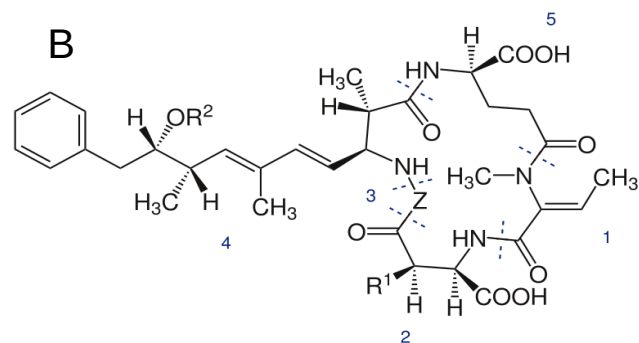
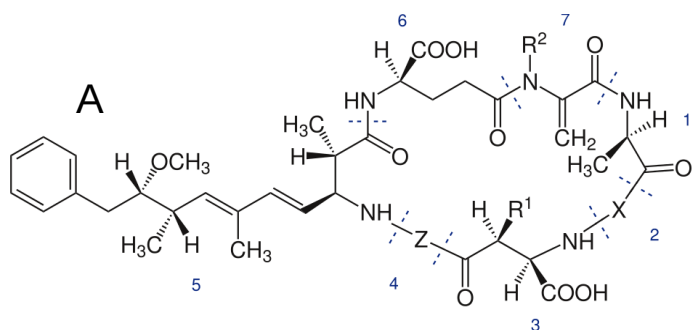


Figure 61: recoveries for (A) *Nostoc* sp. CCMP 2511, (B) oyster and (C) mussel matrices spiked before extraction with the three different methanol – 0.1 M acetic acid mixtures (MeOH 25%/0.1 M AcOH (white bars), MeOH 50%/0.1 M AcOH (grey bars) and MeOH 75%/0.1 M AcOH (black bars)). Results are expressed relatively to recovery obtained with the selected extraction solvent (*i.e.* MeOH 75%/0.1 M AcOH). The high differences of recoveries for CYN and ATX in *Nostoc* sp. are exacerbated by the fact the low recoveries were obtained.

Table 37: matrix effects on retention times for CYN, ATX, HATX and STX, expressed as a shift (min) between the standards spiked in the matrices and the pure standards (mean $\pm$ SD).

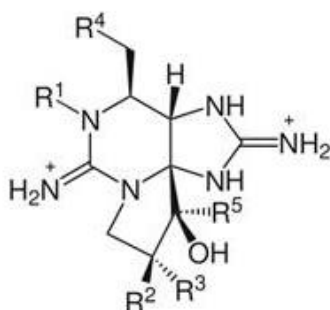
Matrix	Shift of retention time (min)			
	CYN	HATX	ATX	STX
Cyanobacteria	- 0.06 $\pm$ 0.03	-2.90 $\pm$ 0.01	-3.53 $\pm$ 0.01	-1.58 $\pm$ 0.01
Oyster	0.02 $\pm$ 0.01	-2.91 $\pm$ 0.01	-3.55 $\pm$ 0.02	-0.80 $\pm$ 0.01
Mussel	0.02 $\pm$ 0.01	-2.92 $\pm$ 0.01	-3.56 $\pm$ 0.02	-1.13 $\pm$ 0.05

Annexe 3 : sites et substitutions pour différents analogues de la microcystine et de la nodularine. Adapté de Hiller et al. (2007).



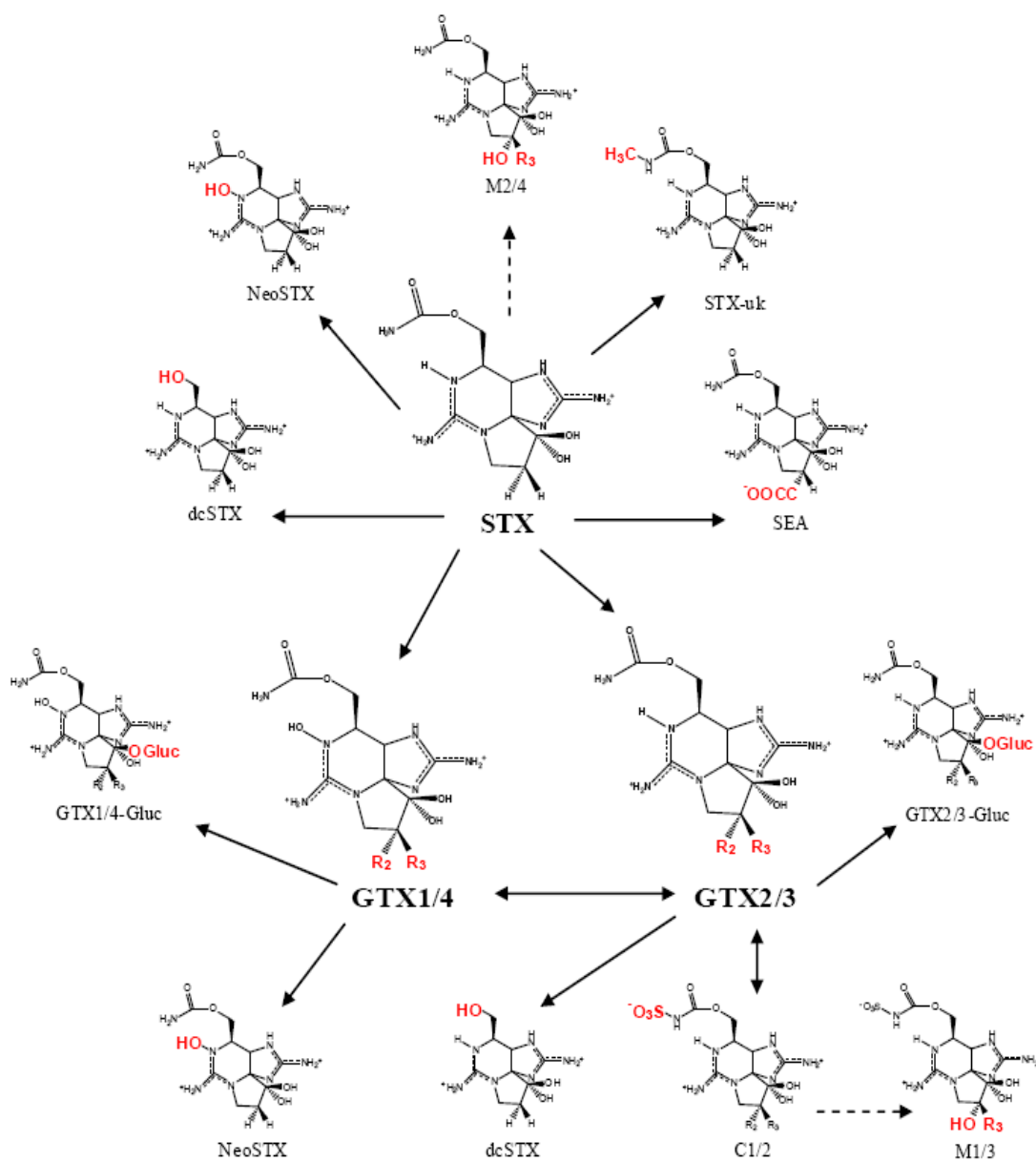
AA1	X	AA3	Z	AA5	AA6	AA7	Toxine
D-Ala	L-Leu	D-MeAsp	L-Arg	Adda	D-Glu	Mdha	Microcystine-LR et différents analogues
D-Ser	L-Arg	D-Asp	L-Aib	ADM Adda	D-MeGlu	Dha	
	L-Ala		L-Ala	DM Adda	E(OMe)	Dhb	
	L-Glu		L-Glu	(6Z) Adda		L-Ala	
	L-Har		L-Har			L-Ser	
	L-Hil		L-Hph			Mdhb	
Mdhb	MeAsp	Arg	Adda	Glu			Nodularine (NOD)
Mdhb	Asp	Arg	Adda	Glu			[Asp ²]-NOD
Dhb	MeAsp	Arg	Adda	Glu			[Dhb ¹]-NOD

Annexe 4 : structure de la saxitoxine et certains de ses analogues produits par différents genres de cyanobactéries . Elles sont également produites par plusieurs dinoflagellés marins sauf les LWTX, produites spécifiquement par *Lyngbya wollei*. Adapté de Wiese et al., 2010.

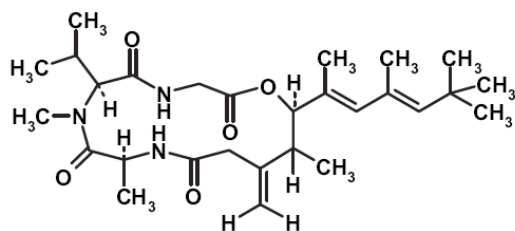


Groupe	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Toxine
Non sulfatées	H	H	H		OH	STX
	OH	H	H		OH	neoSTX
Mono-sulfatées	OH	H	OSO ₃ ⁻		OH	GTX1
	H	OSO ₃ ⁻	H		OH	GTX3
	OH	H	H		OH	GTX6 (B2)
	H	OSO ₃ ⁻	H		OH	C2
Décarbama tées	OH	H	H	OH	OH	dcneoSTX
	H	H	OSO ₃ ⁻	OH	OH	dcGTX2
Toxines de <i>L. wollei</i>	H	H	OSO ₃ ⁻		H	LWTX1
	H	OSO ₃ ⁻	H		OH	LWTX3
	H	H	H		H	LWTX6

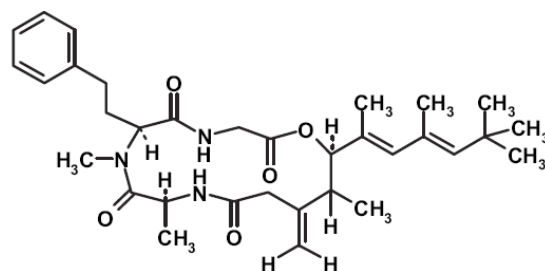
Annexe 5 : schéma de biotransformation des PSTs. Les groupes indiqués en rouge correspondent à la modification apportée par rapport au composé de base, la STX. Les lignes pleines correspondent à des bioconversions connues alors que les lignes en pointillées sont des conversions supposées (Wiese et al., 2010).



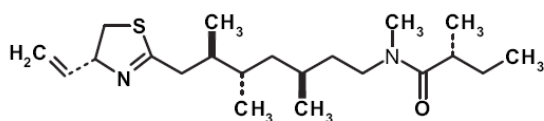
Annexe 6 : structure de certains lipopeptides neurotoxiques, comme rapporté par (Araoz et al., 2010)



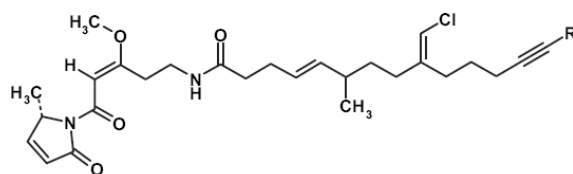
Antillatoxin A



Antillatoxin B



Kalkitoxin



Jamaicamide (general structure)

Annexe 7 : caractéristiques des principales classes de cyanotoxines basé sur (van Apeldoorn et al., 2007; Araoz et al., 2010; Metcalf and Codd, 2012; Moreira et al., 2013)

	Toxines	Caractéristiques	Mode d'action/cible	Exemples de producteurs	DL ₅₀
Hépatotoxines	Microcystines	Heptapeptides cycliques > 100 variants qui diffèrent selon la nature de l'acide aminé en position 2 et 4 PM : 800-1100 Da	inactivations des protéines phosphatases -> dégénérescence du cytosquelette -> lyse cellulaire -> hémorragie Reins + intestins Promoteurs tumoraux	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Phormidium</i>	50-1200 µg.kg ⁻¹
	Nodularines	Pentapeptides cycliques 9 variants PM : 824 Da (Nodularine-R)		<i>Nodularia spumigena</i>	Quelques variants non toxiques
Cytotoxine	Cylindrospermopsines	Alcaloïde 4 variants dont un non toxique PM : 415 Da (CYN)	Inhibition synthèse protéique Reins, poumons, intestins, thymus touchés Agent génotoxique <i>in vitro</i> et peut-être carcinogène	<i>Cylindrospermopsis raciborskii, Aphanizomenon olivaceum, Anabaena sp., Umezakia natans</i>	2100 µg.kg ⁻¹
Neurotoxines	Anatoxine-a Homoanatoxine-a Et analogues	Alcaloïde PM : 165 Da et 179 Da (ATX et HATX) 10 variants	Agoniste de l'acétylcholine -> inhibition irréversible des récepteurs -> dépolarisation post-synaptique de la jonction neuromusculaire -> paralysie musculaire	<i>Anabaena flos aquae, Aphanizomenon, Planktothrix, Microcystis, Tychonema bourrellyi</i>	200-250 µg.kg ⁻¹
	Anatoxine-a(s)	Organophosphoré PM : 252 Da	Inhibition acétylcholinestérase -> hyper-activité des neurones post-synaptiques -> paralysie musculaire	<i>Anabaena flos-aquae, Anabaena lemmermanii</i>	20 µg.kg ⁻¹
	PSTs	Alcaloïde 20 variants chez les cyanobactéries PM : 241-491 Da	Inhibition des canaux sodiques voltage dépendant -> blocage transmission nerveuse -> paralysie musculaire	<i>Lyngbya Wollei, Anabaena circinalis, Aphanizomenon flos-aquae, Cylindrospermopsis raciborskii</i>	10 µg.kg ⁻¹ (STX)
Dermatotoxines	Lynbyatoxine A Aplysiatoxine Dééromoaplysiatoxine	alcaloïdes indoles et deux phénols bilactones PM : 437, 592 et 670 Da (Lyngbyatoxine-a, débromo- et aplysiatoxine)	Irritations cutanées et inflammations gastro-intestinales Potentiels promoteurs tumoraux	<i>Lyngbya majuscula, Schizothrix calcicola, Oscillatoria nigroviridis</i>	250 µg.kg ⁻¹ ≈ 107 µg.kg ⁻¹
	LPS	Lipopolysaccharide	Réactions allergiques et toxiques	Toutes les cyanobactéries	

PM : Poids moléculaire ; DL₅₀ : Dose létale 50 %

Annexe 8 : utilisation de la SPE pour l'extraction/purification des échantillons contenant des cyanotoxines.

La SPE est la technique la plus utilisée pour la concentration/purification des échantillons contenant des cyanotoxines (van Apeldoorn et al., 2007). Différents adsorbants ont été employés en fonction de la structure chimique des composés. Pour les molécules les plus apolaires (e.g. hépatotoxines) les adsorbants C18, polymériques (e.g. Oasis® HLB, Strata™-X), mode mixte phase polymérique-échanges cationiques (e.g. Oasis® MCX) voire les colonnes d'immunoaffinité (*i.e.* liaison spécifique anticorps/analyte) ont été utilisées (Harada et al., 1988; Aranda-Rodriguez et al., 2003; Mekebri et al., 2009; Li et al., 2014). L'extraction sur phase solide des toxines les plus polaires n'est pas compatible avec les cartouches C18. Cependant, l'anatoxine-a et ses analogues peuvent être extraits avec un adsorbant mixte phase polymérique-échanges cationiques (*i.e.* Supelclean™ LC-WCX) (Furey et al., 2003) alors que des phases dérivées du charbon graphite sont efficaces pour la cylindrospermopsine et les PSTs (Nicholson and Burch, 2001; Norris et al., 2001; Boundy et al., 2015).

Récemment, des techniques d'échantillonnage passif (*i.e.* SPATT, solid phase adsorption toxin tracking) ont été développées pour la concentration *in situ* de toxines sous forme dissoute. Ces échantillonneurs utilisent des adsorbants similaires à ceux employés pour la SPE (e.g. Strata™-X) et sont déployés dans l'environnement pendant un certain temps (e.g. 3 à 7 jours) avant d'être extraits. Ils ont prouvé leur efficacité pour la concentration des formes dissoutes d'anatoxine-a et analogues (Wood et al., 2011), ainsi que des microcystines (Kudela, 2011).

En pratique, les rendements d'extraction par SPE dépendent du type d'adsorbant mais également de la matrice et de la nature des composés à extraire. Des bons rendements sont obtenus pour des matrices simples (*i.e.* $\geq 70\%$ pour les eaux de surface avec Oasis® HLB (Aranda-Rodriguez et al., 2003)) alors que pour les matrices plus complexes comme les mollusques, il est possible d'observer un effet matrice sur les rendements d'extraction. Ainsi, (Yang et al., 2009) rapportent d'excellents rendements d'extraction SPE de 7 standards de MCs avec un adsorbant Oasis® HLB (*i.e.* entre 80 et 99 %) alors qu'ils sont plus faibles et plus variables dans les mollusques (*i.e.* entre 44 et 94 %). De même, (Cadel-Six et al., 2014) observent une grande variation des rendements d'extraction de la MC-LR avec la cartouche Strata™-X, en fonction de l'organe de poisson considéré (*i.e.* 36% pour les muscles vs. 81 % pour l'intestin).

La concentration/purification simultanée de différentes classes de cyanotoxines n'est pas facile, tout comme leur extraction. Ainsi, (Chen et al., 2012) rapportent que leur méthode d'extraction de 12

toxines de classes différentes n'est pas adaptée pour l'anatoxine-a, la cylindrospermopsine et la nodularine (*i.e.* rendements entre 0,5 et 42 % avec une SPE sur cartouche C18). Une alternative consiste à utiliser différents types d'adsorbants, parfois en série, pour bénéficier des différences de sélectivité et obtenir de bons rendements. De cette façon, (Yen et al., 2011) rapportent des rendements supérieurs à 83 % suite à l'extraction de neuf cyanotoxines de polarité différentes en utilisant une cartouche C18 pour les MCs et une cartouche de charbon graphite (*i.e.* Supelclean™ ENVI-Carb) pour la CYN et l'ATX.

Annexe 9 : cas d'intoxications aux cyanotoxines rapportés ou suspectés pour l'Homme (Ibelings et al., 2014).

Plusieurs cas d'intoxications ont été rapportés (tableau 38), attribués à la présence de cyanobactéries et/ou à leurs toxines. Certains de ces cas sont tristement célèbres, comme le décès de patients dialysés avec de l'eau contenant des MCs au Brésil. La plupart des intoxications documentées sont liées aux cyanobactéries productrices de microcystines, via la consommation d'eau ou l'exposition lors d'activités récréatives. Certaines intoxications alimentaires liées à la consommation de poissons ou de la chair de tortue contaminés par des toxines de *Lyngbya majuscula* auraient néanmoins été observées (Osborne et al. 2001).

Tableau 38 : intoxications humaines liées aux cyanobactéries et/ou à leurs toxines.

Toxine suspectée	Contexte de l'intoxication, lieu, effets observés	Référence
ATX	Pas d'intoxication humaine rapportée. Mortalités d'animaux observées (e.g. décès de chiens en France)	Chorus and Bartram, 1999 Gugger et al., 2005
CYN	« Palm Island mystery disease » (Australie), 140 enfants et 10 adultes hospitalisés pour douleurs au foie, diarrhées, dommages rénaux après avoir consommés de l'eau d'une réserve contenant un bloom dense de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bourke et al., 1983
MCs	« Caruaru syndrome » où 131 patients dialysés (Brésil) dont 56 décès 10 militaires malades (Angleterre) après avoir nagé dans un bloom de <i>Microcystis</i> toxique, dont 2 hospitalisés pour pneumonie 2000 cas de gastroentérite dont 88 décès (Brésil) sur une attribués à un bloom de cyanobactérie très toxique dans la réserve d'eau potable	Azevedo et al., 2002 Turner et al., 1990 Teixera et al., 1993
LWTX	« Swimmers' itch » ou « seaweed dermatitis » (Hawaï, Australie, Japon) inflammations de la peau rapportée après avoir nagé dans une eau contenant un bloom de <i>Lyngbya majuscula</i> Intoxications alimentaires rapportées aussi (e.g. consommation de poissons, d'algues)	Voir détails dans Osborne et al., 2001
NOD	Pas d'intoxication humaine rapportée. Mortalités d'animaux observées (e.g. canards, chiens, bétail)	WHO, 2003
PSTs	Fièvre, irritations, douleurs abdominales et éruptions cutanées pour des enfants après la baignade dans des lacs présentant des blooms de cyanobactéries, dont <i>Anabaena lemmermannii</i>	Rapala et al., 2005

Récemment, le réseau de surveillance des blooms d'algues toxiques et des maladies associées (HABISS, Harmful Algal Bloom-related Illness Surveillance System) a été créé par le National Center for Environmental Health aux Etats-Unis (Backer et al., 2015). Ce réseau avait notamment pour mission de récolter les rapports sur les intoxications/mortalités humaines et animales suspectées d'être associées aux blooms d'algues et de cyanobactéries, entre 2007 et 2011 aux Etats-Unis. Ainsi, 458 rapports

suspects ou confirmés ont été recensés mais peu sont concernés par les cyanobactéries et leurs toxines, par rapport à la ciguatera (*i.e.* < 13% vs. 54 %).

Le réseau HABISS est le premier à avoir conduit une surveillance à grande échelle dans les eaux américaines. Même si les risques associés aux toxines de microalgues sont connus depuis des décennies, l'identification précise des cas d'intoxication reste un challenge (*i.e.* diagnostic d'exclusion). Les blooms de microalgues constituent un problème de santé publique qui nécessitent une attention à différents niveaux (e.g. local, national, international).

Annexe 10 : principe de la procédure de purification de BMAA par les cartouches SPE mixte phase polymérique-échanges cationiques, type Oasis® MCX.

La BMAA et ses isomères sont des acides aminés basiques très polaires (figure 62). En présence d'un pH acide, ils sont chargés positivement (si la valeur du pH est $\leq (\text{pK}_a - 2)$, *i.e.* $\text{pH} \leq 4,5$ pour la BMAA).

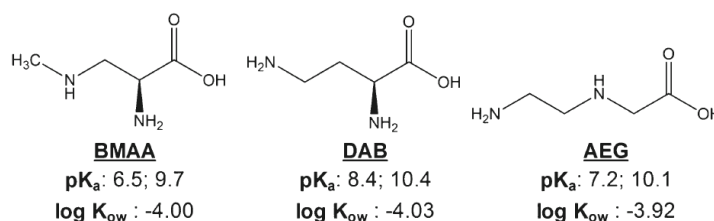


Figure 62 : structure chimique, pK_a et $\log K_{ow}$ pour la BMAA et deux de ses isomères. Repris de Roy-Lachapelle et al., 2015.

Il est donc possible d'effectuer une purification d'échantillons contenant la BMAA et ses isomères par échanges cationiques. En effet, les adsorbants mixtes (e.g. polymériques ou phases inverses) sont greffés avec des groupements sulfonyles qui sont constamment chargés négativement (figure 63).

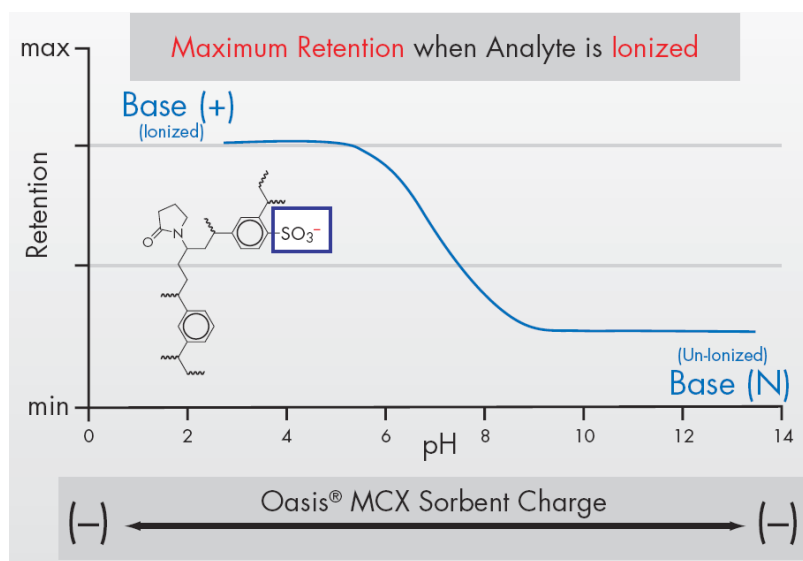
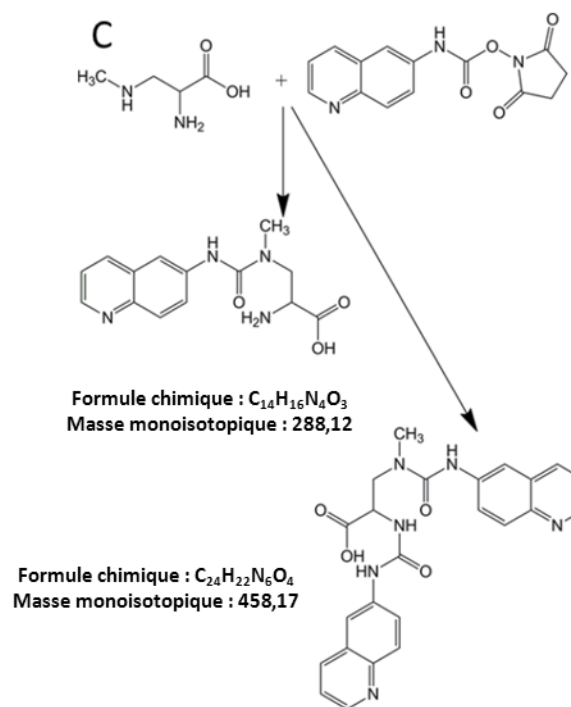
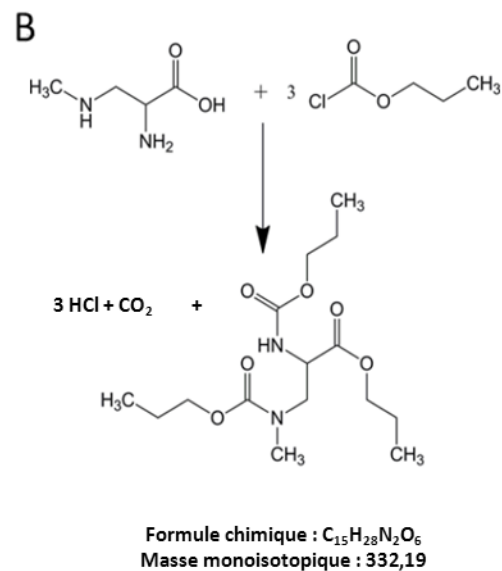
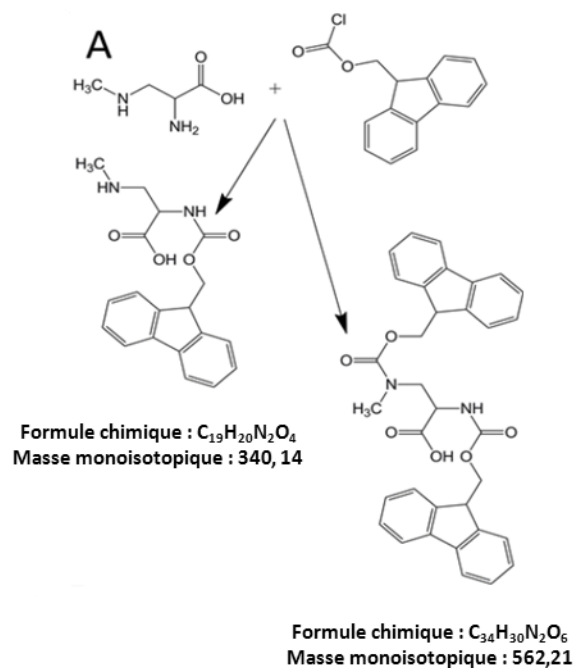


Figure 63 : mécanismes de rétention des analytes sur l'adsorbant Oasis® MCX mixte phase polymérique-échange de cations.

Le pH de l'échantillon doit donc être ajusté ($\text{pH} \leq 4$) avant dépôt sur la cartouche. La BMAA et ses isomères, chargés positivement, sont retenus sur les groupes sulfonyles. Après rinçages (e.g. avec un acide pour supprimer les molécules faiblement retenues par les échanges ioniques et un solvant organique), les analytes sont élués par modification du pH et donc changement de l'état d'ionisation pour la BMAA et ses isomères (e.g. avec de l'hydroxyde d'ammonium les molécules neutres voire chargées positivement ne sont plus retenues). De plus, les ions ammoniums vont jouer le rôle de contre-ions, favorisant l'élution de la BMAA et ses isomères.

Annexe 11 : schémas de derivation publiés pour la BMAA réagissant avec différents agents de dérivation. (A) le dérivé FMOC, (B) le dérivé propylchloroformate et (C) le dérivé AQC.



Annexe 12 : tableau résumant les principales méthodes analytiques développées pour l'analyse de la BMAA et ses isomères.

Référence	Extraction	SPE	Dérivation / détection	Etalon interne	Rendements d'extraction		Critères d'identification	LOD/LOQ (colonne)	LOQ (matrice)	Matrices
					BMAA	DAB				
Murch et al., 2004 a et b	TCA 0,1 M HCl 6 M	Sep-pak C18	AQC / FLD		> 96 %		RT (vérification LC-MS)	0,1 / 13 nmol		Cyanobactérie, cycas, chauve- souris, cerveau humain
Kubo et al., 2008	HCl 0,1 M	MCX	HILIC-SM		80 - 90 %		RT et ion 119,1	/ 0,5 ng		Cyanobactéries
Rosen et Hellenas 2008	TCA 0,1 M HCl 6 M		HILIC-SM/SM	D ₃ BMAA			RT, ions (119>102, <u>88</u> , <u>76</u> , <u>73</u> , 44) et ratios		< 1 µg/g (libre) < 4 µg/g (liée)	Cyanobactéries et graines de cycas
Jonasson et al., 2010	MeOH 80% HCl 6M (totale)	Isolute HCX-3	AQC/SM/SM				RT et ions (459>119, <u>258</u> , <u>188</u>)	70 fmol (8.3 pg) /		Cyanobactéries, zooplancton, poissons et mollusques
Krüger et al., 2010	TCA 0.1M HCl 6 M poolés		HILIC-SM/SM		80 - 94 % (libre) 71 - 88 % (liée)	90 - 93 % (libre) 79 - 98 % (liée)	RT et ions (119 > 102, <u>88</u> , <u>76</u> , <u>101</u> , <u>74</u> , <u>56</u> , 44)		1 µg/g (BMAA) 0,06 µg/g (DAB)	Cyanobactéries et compléments alimentaires
Faassen et al., 2012	TCA 0.1 M HCl 6M (totale)		HILIC-SM/SM (AQC/ SM/SM AQC / FLD)	D ₃ BMAA	85.5% (libre) 69.3% (total)		RT, ions (119 > 102, <u>88</u> , <u>76</u> , <u>101</u> , <u>74</u>) et ratios (<u>88/102</u> , <u>76/102</u> et <u>74/101</u>)	106/317 fmol (12,5/37,4 pg)	0,4/1,6 µg/g	Cyanobactéries et plantes (algue verte et cycas)
Combes et al., 2013	TCA 0.1M	MCX	HILIC-SM/SM	D ₃ DAB	66 - 88 %	70 - 87 %	RT et ions (119 > 102, <u>101</u>)	5/15 pg (BMAA, DAB et D ₃ DAB)	0,6 µg/g (cyano) 0,2 µg/g (biofilm)	Eau de rivière, biofilms, cyanobactéries
Jiang et al., 2013	80% MeOH Puis HCl 6M (total) et LLE	HCX-3	AQC-MS/MS	D ₃ BMAA	63,3 %		RT, ions (459 > 119, <u>258</u> , <u>188</u> et <u>214</u>) et ratios (<u>119/258</u> ±10%)	/ 0,5 pg (4,23 fmol)	0,1 µg/g	Cyanobactérie
Salomonsson et al., 2013	TCA 0.1M HCl 6M (total)		DNS-SM/SM	D ₃ BMAA	83,5 %		RT et ions (585 > 277, 170, <u>88</u> , <u>71</u>)		0,15 µg/g (WW)	Moule
Berntzon et al., 2015	Acétone HCl 6M (libre et liée hydrolysés)		AQC-SM/SM	D ₃ BMAA			RT (± 5%), ions (459 > 119, <u>258</u> , <u>188</u> et <u>214</u>) et ratio (<u>119/258</u> ± 20%)	0,42 pg /	57 pg/mL 1,7 µg/mL 134 ng/mL	Liquide céphalo rachidien, sang et plasma (SLA vs. Témoins)

WW : wet weight ou poids humide. Les critères ayant permis l'identification de la BMAA et ses isomères sont en gras, ceux spécifique à la BMAA ou à ses isomères sont soulignés

Annexe 13 : ensemble des souches de microalgues (procaryotes et eucaryotes) criblées lors de ces travaux de thèse pour rechercher la BMAA et ses isomères sous forme libre (parfois) et totale (systématiquement). Lorsque plusieurs échantillons étaient disponibles [différentes conditions de culture (e.g. nombre de jours, milieu)] les concentrations minimales et maximales obtenues ont été rapportées.

Souche de cyanobactérie (référence)	BMAA totale	DAB libre	DAB total	AEG total
<i>Leptolyngbya</i> sp. (PCC 73110)	< LOD	<LOD – 2,7	1,01 – 1,6	<LOD – 1,7
<i>Nostoc</i> sp. (CCMP 2511)		<LOD – 2,3	0,82 – 13	<LOD
<i>Microcystis aeruginosa</i> (PCC 7806)		<LOD	<LOD	
<i>Nostoc</i> sp. (PCC 7120)		<LOD	-	
<i>Nostoc</i> sp. (PCC 7107)		2,1 – 7,2	-	
<i>Symploca</i> sp. (PCC 8002)		0,3	0,43	
<i>Synechocystis</i> sp. (PCC 6803)		<LOD	<LOD	
<i>Synechococcus elongatus</i> (CCAP1479/1B)		0,23 – 2,7	0,4 – 3,5	<LOD – 1,4
<i>Calothrix crustacea</i> (CCAP1410/9)		0,6 – 0,92	7,0 – 14	<LOD
<i>Nostoc endophytum</i> (CCAP1453/14)		0,34 – 0,55	6,8 – 7,5	<LOD – 1,1
<i>Synechococcus</i> sp. (TES 206 V)		1,1	1,4	<LOD
<i>Synechococcus</i> sp. (TES 206 R)		0,56	2,0	
<i>Synechococcus</i> sp. (TES 206H6)		0,39	1,9	
<i>Synechococcus</i> sp. (TES 206D8)		4,7	4,7	
<i>Pseudoanabaena galeata</i>		-	0,81	
<i>Spirulina platensis</i>		-	0,83	0,24

LOD : Limite de détection ; - non analysé

Souche de diatomée (référence)	BMAA totale	DAB libre	DAB total	AEG total
<i>Chaetoceros calcitrans</i> (CCMP 1315)	<LOD – 0,32	<LOD	3,9 – 28	<LOD – 0,48
<i>Chaetoceros</i> sp. (Argenton)	<LOD – 1,6		8,5 – 44	<LOD – 0,37
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (CCAP 1055/1)	<LOD – 1,4		<LOD – 1,3	<LOD
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (CCMP 1015)	<LOD – 1,8	1,4	2,9 – 18	<LOD – 0,30
<i>Amphora coffeaeformis</i> (CCAP 1001/2)	0,16*	-	0,66	0,25
<i>Skeletonema marinoi</i> (CCMP 1332)	<LOD	<LOD	1,1	<LOD
<i>Skeletonema pseudocostatum</i> (Bouin)		0,28 – 0,43	1,6	0,28
<i>Thalassiosira pseudonana</i> (CCAP 1085/12)	<LOD – 1,6**	<LOD – 0,68	0,23 – 7,1	0,23 – 3,7
<i>Thalassiosira weiss flogii</i> (CCMP 1336)	<LOD	0,29	1,1	<LOD
<i>Chaetoceros pumilum</i> (Argenton)		1,2	5,5	
<i>Asterionellopsis glacialis</i> (CCMP 139)		1,1 – 1,3	2,7 – 3,1	0,6
<i>Odontella aurita</i> (AC 815)		0,24 – 0,40	4,6 – 5,3	0,35
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (P5C1)		-	3,5	< LD
<i>Fragililaria pinnata</i>		-	1,62	0,48

LOD : Limite de détection ; - non analysé ; *Concentration <LOQ mais identité BMAA confirmée en injectant 10 µL ;

** Milieu de culture : Conway classique + jus d'algue (*Laminaria*) ; remarque : pas de BMAA dans le jus d'algue

Souche de dinoflagellé (référence)	BMAA totale	DAB libre	DAB total	AEG total
<i>Alexandrium catenella</i> (C2-4)	<LOD	0,23	1,3	0,53
<i>Alexandrium catenella</i> (C11-4)		0,74	3,7	0,61
<i>Alexandrium minutum</i> (AM99PZ)		<LOD	0,63	<LOD
<i>Heterocapsa triquetra</i> (HT99PZ)		-	5,1	
<i>Prorocentrum micans</i> (PM85BV)		-	1,2	2,1
<i>Pyrocystis noctulica</i> (CCMP 732)		-	5,0	0,23
<i>Scrippsiella trochoïdea</i> (ST97PZ)		-	1,5	<LOD
<i>Symbiodinium microadriaticum</i> (CCMP 828)		-	1,1	

LOD : Limite de détection ; - non analysé

Souches d'autres microalgues (référence)	BMAA totale	DAB libre	DAB total	AEG total
<i>Hemiselmis</i> sp. (RCC 659)	<LOD	-	3,9	<LOD
<i>Proteomonas</i> sp. (RCC 3072)		-	0,45	
<i>Rhinomonas</i> sp. (RCC 821)		-	0,9	
<i>Rhodomonas salina</i> (RCC 1506)		-	1,1	
<i>Rhodomonas</i> sp. (RCC 1978)		-	0,85	
Cryptophyte non identifié (France)		-	1,7	
<i>Ostreococcus tauri</i> (H95)		0,31 – 1,1	8,7	4,7
<i>Tetraselmis suecica</i>			0,27	0,34
<i>Chlamydomonas reginae</i> (CCAP 11/78)		-	0,95	0,66
<i>Chlorella vulgaris</i> (CCAP 211/25)		-	3,5	0,76
<i>Dunaliella salina</i> (CCAP 19/18)		-	3,1	<LOD
<i>Emiliana huxleyi</i> (CCMP 371)		-	1,6	
<i>Eutreptiella gymnastica</i> (CCMP 1594)		-	2,6	<LOD
<i>Porphyridium purpureum</i> (CCAP 1380/5)		-	0,42	0,29
<i>Tisochrysis lutea</i> (CCAP 927/14)		-	2,7	<LOD

LOD : Limite de détection ; - non analysé

Thèse de Doctorat

Damien REVEILLON

BMAA et cyanotoxines : microalgues productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins

BMAA and cyanotoxins: Producing-microalgae and accumulation levels in marine organisms

Résumé

La BMAA (β -N-méthylamino-L-alanine) est un acide aminé non protéique neurotoxique associé à la sclérose latérale amyotrophique dont la détection souffre d'une controverse analytique remettant en question sa production par l'ensemble des cyanobactéries. Notre premier objectif était donc de développer une méthode d'analyse de la BMAA et ses isomères, très sélective, par chromatographie HILIC couplée à la spectrométrie de masse. Nous avons ensuite cultivé et criblé une cinquantaine d'espèces de microalgues (e.g. cyanobactéries, diatomées). Contrairement au DAB, un isomère largement retrouvé, la BMAA a été découverte seulement dans 5 souches de diatomées, remettant en question sa qualification de cyanotoxine. En parallèle, nous avons évalué la présence de BMAA sur les côtes françaises. Elle a été détectée dans différents compartiments de l'écosystème de Thau (*i.e.* plancton, biofilm et moule) nous amenant à émettre l'hypothèse d'une bioaccumulation, avec les diatomées comme source de BMAA. De plus, tous les mollusques collectés mensuellement dans 10 zones conchylicoles en 2013 contiennent la BMAA et ses isomères, suggérant qu'ils sont continuellement présents dans les bivalves alors que le mécanisme de bioaccumulation n'est pas connu. Une première expérience de contamination au laboratoire révèle un possible lien, à confirmer, entre l'accumulation de BMAA dans les moules et leur consommation d'une diatomée productrice de BMAA. Enfin, la procédure d'analyse multi-cyanotoxines développée a permis la détection de cylindrospermopsine dans le biofilms de coquillages de Thau, suggérant l'intérêt de poursuivre les travaux quant à la problématique « cyanotoxines » dans l'environnement marin.

Mots clés

BMAA, DAB, cyanotoxines, CL-SM/SM, diatomées, cyanobactéries, bivalves

Abstract

BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) is a non proteinogenic neurotoxic amino acid that has been associated with amyotrophic lateral sclerosis. Its analytical detection is widely debated thus the global production of BMAA by cyanobacteria is questioned. We first aimed at developing an analytical method allowing for highly selective identification of BMAA and isomers, using HILIC chromatography coupled to mass spectrometry. Then, we have cultivated and analyzed more than 50 microalgae (e.g. cyanobacteria, diatoms). Unlike DAB, one of its natural isomer, BMAA was only reported in five diatom species and cannot be accounted as a cyanotoxin anymore. In parallel, we have evaluated the presence of BMAA on the three French coasts. The presence of BMAA in different compartments of the Thau lagoon food web (*i.e.* plankton, biofilm and mussel) led us to hypothesize a bioaccumulation pathway with diatom as a source of BMAA. Moreover, BMAA and DAB were both detected in all mollusk samples collected once a month in 2013 from 10 French shellfish production areas. While they were continuously detected, the bioaccumulation mechanism of these amino acids is unknown. Therefore, we tried to contaminate blue mussels in controlled conditions with a BMAA-producing diatom. Results of this first attempt may suggest a link between the accumulation of BMAA in mussel and their consumption of the diatom strain. Finally, the multi-cyanotoxins analytical procedure that we developed allowed us to detect cylindrospermopsin in biofilms collected from mussels of Thau lagoon, calling for extended research efforts on cyanotoxins-derived issue in the marine environment.

Key Words

BMAA, DAB, cyanotoxins, LC-MS/MS, diatoms, cyanobacteria, bivalves