

Université de Montréal

Analyse de la neurotoxine β -méthylamino-L-alanine (BMAA) et ses isomères dans les lacs et les réservoirs pollués par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution.

Par

Safa Abbes

Département de chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en Chimie
Option Chimie Analytique Environnementale

© Abbes, 2022

Université de Montréal
Département de chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Ce mémoire intitulé

Analyse de la neurotoxine β -méthylamino-L-alanine (BMAA) et ses isomères dans les lacs et réservoirs pollués par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution.

Présenté par

Safa Abbes

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Pierre Thibault

Président-rapporteur

Sébastien Sauvé

Directeur de recherche

Patrick Hayes

Membre du jury

Résumé

La neurotoxine β -N-méthyl-amino-l-alanine (BMAA) et ses isomères, notamment la N-(2-aminoéthyl glycine) (AEG), la β -amino-N-méthyl alanine (BAMA) et l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB), ont été détectés précédemment dans des échantillons de cyanobactéries. Cependant, il existe des rapports contradictoires concernant leur présence dans les eaux de surface. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de l'acide trichloracétique (TCA 0,1M) sur la détection des isomères de BMAA, par rapport aux protocoles préexistants. Une méthode instrumentale sensible a été utilisée pour l'étude, avec des limites de détection de l'ordre de 5-10 ng L⁻¹. Des meilleures limites de détection plus élevées et des niveaux significativement plus importants (test des rangs signés de Wilcoxon appariés, $p < 0,001$) d'isomères de BMAA ont été observés dans les échantillons traités par le TCA, avec des augmentations relatives allant jusqu'à +725 % pour l'AEG et +1450 % pour le DAB, et des augmentations de concentration absolue allant jusqu'à +15 000 ng L⁻¹ pour l'AEG et +650 ng L⁻¹ pour le DAB. Nous avons également documenté les tendances de la présence des isomères de BMAA dans plusieurs lacs de différents pays tels que le Brésil, le Canada, la France, le Mexique et le Royaume-Uni. Les données obtenues au cours de cette étude ($n = 390$ provenant de 45 sites d'échantillonnage) indiquent des détections fréquentes des isomères AEG et DAB, avec des taux de détection de 30 % et 43 % et des niveaux maximums de 19 000 ng L⁻¹ et 1 100 ng L⁻¹, respectivement. En revanche, le BAMA a été trouvé dans moins de 8 % des échantillons d'eau, et la BMAA n'a été trouvée dans aucun échantillon. Ces résultats appuient les analyses des cyanobactéries libres, dans lesquelles la BMAA a souvent été détectée avec des concentrations inférieures de 2 à 4 ordres de grandeur à celles de l'AEG et du DAB. Les mesures saisonnières effectuées dans deux lacs impactés par des efflorescences ont indiqué des corrélations limitées entre les isomères de la BMAA et les microcystines totales ou la chlorophylle-a, ce qui mériterait une étude plus approfondie.

Mots clés

Eau de lac ; β -N-méthyl-amino-l-alanine (BMAA) ; acide 2,4-diaminobutyrique (DAB) ; N-(2-aminoéthyl) glycine (AEG) ; acide trichloracétique (TCA) ; tendances temporelles.

Abstract

The neurotoxic alkaloid β -N-methyl-amino-l-alanine (BMAA) and related isomers, including N-(2-aminoethyl glycine) (AEG), β -amino-N-methyl alanine (BAMA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB), have been reported previously in cyanobacterial samples. However, there are conflicting reports regarding their occurrence in surface waters. In this study, we evaluated the impact of amending lake water samples with trichloroacetic acid (0.1M TCA) on the detection of BMAA isomers, compared with pre-existing protocols. A sensitive instrumental method was enlisted for the survey, with limits of detection in the range of 5-10 ng L⁻¹. Higher detection limits and significantly greater levels (paired Wilcoxon's signed-rank tests, $p < 0.001$) of BMAA isomers were observed TCA-amended samples (method B) compared to samples without TCA (method A). The overall range of B/A ratios was 0.67-8.25 for AEG (up to +725 %) and 0.69-15.5 for DAB (up to +1450 %), with absolute concentration increases TCA-amended samples up to +15,000 ng L⁻¹ for AEG and +650 ng L⁻¹ for DAB. We also documented the trends in the occurrence of BMAA isomers for a large breadth of field-collected lakes from Brazil, Canada, France, Mexico, and the United Kingdom. Data gathered during this overarching campaign (overall $n = 390$ within 45 lake sampling sites) indicate frequent detections of AEG and DAB isomers, with detection rates of 30 % and 43 % and maximum levels of 19,000 ng L⁻¹ and 1,100 ng L⁻¹, respectively. In contrast, BAMA was found in less than 8 % of the water samples, and BMAA not found in any sample. These results support analyses of free-living cyanobacteria, wherein BMAA was often reported at concentrations 2-4 orders of magnitude lower than AEG and DAB. Seasonal measurements conducted at two bloom-impacted lakes indicated limited correlations of BMAA isomers with total microcystins or chlorophyll-a, which deserves further investigation.

Keywords

Lake water; β -N-methyl-amino-l-alanine (BMAA); 2,4-diaminobutyric acid (DAB); N-(2-aminoethyl) glycine (AEG); Trichloroacetic acid (TCA); Temporal trends.

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Liste des sigles et acronymes.....	10
Remerciements.....	11
Chapitre 1. Introduction	12
1.1 Problématique de la neurotoxine β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA).....	12
1.2 Objectifs du projet	15
1.3 structure du mémoire	15
Chapitre 2. La β-méthylamino- l -alanine (BMAA)	17
2.1 Historique de la BMAA	17
2.2 Définitions et structures chimique de BMAA et ses isomères	21
2.2.1 Définition de la BMAA	21
2.2.2 Les isomères de BMAA	22
2.3 Toxicité de BMAA et ses isomères	23
2.4 Les différentes formes de BMAA	26
Chapitre 3. Les méthodes analytiques	29
3.1 Les méthodes déjà utilisées pour l'analyse du BMAA	30
3.2 Les méthodes de préparation des échantillons.....	32
3.2.1 Dérivation des échantillons	32
3.2.2 L'extraction de BMAA	37
3.3 Préparation analytique par chromatographie liquide	40
Chapitre 4. Partie Expérimentale	44
4.1 Échantillonnage de l'eau de surface.....	44
4.2 Préparation des échantillons	45
4.3 Analyse instrumentale	46
4.4 Validation de la méthode analytique et contrôle qualité	48
4.5 Traitement des données et analyses statistiques	49
Chapitre 5. Présence des isomères de la BMAA dans les lacs et réservoirs pollués par des algues au Brésil, au Canada, en France, au Mexique et au Royaume-Uni	50
5.1 Introduction.....	53
5.2 Results and discussion.....	56
5.2.1 Influence of TCA addition	56

5.2.2 Occurrence trends of BMAA isomers in 390 lake samples.....	59
5.2.3 Monitoring of two CyanoHAB impacted lakes during the bloom season	62
5.3 Conclusion.....	65
5.4 Materials and methods	67
5.4.1 Chemicals and standards	67
5.4.4 Instrumental analysis	69
5.4.6 Data curation and statistical analyses.....	72
5.5 Supporting information.....	74
Chapitre 6. Conclusion	90
Références	92

Liste des figures

Figure 1 : Structure moléculaire du BMAA	13
Figure 2 : La plante de cycadale (photo prise par Forest & Kim Starr 16 juillet 2008).....	17
Figure 3 : Structure chimique de (A) BMAA, (B) Alanine	22
Figure 4 : Voie de biosynthèse du BMAA [33]	22
Figure 5 : Structures chimiques de BMAA et ses isomères [35].....	23
Figure 6 : La pénétration de la β - N -méthylamino-L-alanine (BMAA) dans l'intestin [15] ..	24
Figure 7 : Schéma explicatif des phénomènes de bioaccumulation, d'eutrophisation et de bioamplification de BMAA dans un réseau trophique marin ainsi que l'effet de cette neurotoxine sur les humains [33]	25
Figure 8 : L'impact de BMAA sur les récepteurs NMDA et AMPA, ce qui provoque des flux migratoires des ions résultants une dépolarisation des neurones, une variation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaires, formation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et la mort cellulaire [33]	26
Figure 9 : La BMAA apparait comme une couche verte dans les racines du Cycas [46]	27
Figure 10 : Les différentes formes de BMAA. Les BMAA libres et solubles se trouvent dans l'extrait d'acide trichloroacétique (TCA). La BMAA totale est la somme des trois	27
Figure 11 : L'efficacité des différentes méthodes analytiques (le pourcentage d'études pour chaque méthode) [8].....	30
Figure 12 : Les réactions de dérivations de BMAA et ses isomères	37
Figure 13 : Les étapes de la séparation SPE en ligne couplé à la chromatographie liquide	40
Figure 14 : Le principe d'ionisation par électronébuliseur (<i>electrospray</i> -ESI) [89]	41
Figure 15 : Schéma d'un appareil Q-Exactive [91].....	43
Figure 16 : Emplacement géographique des 45 sites d'échantillonnage contrôlés dans la présente étude, y compris les eaux de surface intérieures du Brésil (BRA), du Canada (Ontario (ON), Québec (QC) et Saskatchewan (SK)), de la France (FR), du Mexique (MEX) et du Royaume-Uni (UK). L'échantillonnage a été effectué à différents endroits dans certains lacs pour tenir compte des variations locales des CyanoHAB (p. ex., sites 4, 5, 9, 30, 28 et 34), des différentes profondeurs de la colonne d'eau (p. ex., site 4) ou des différents jours pendant l'échantillonnage saisonnier à haute intensité (p. ex., sites 4 et 34), ce qui a donné un nombre total de n = 390 échantillons d'eau environnementale à analyser	45

Liste des tableaux

Tableau 1. Les études antérieures effectuées sur des organismes vivant avec la BMAA [13] ..	19
Tableau 2. Résumé des méthodes de séparation du BMAA et ses isomères avec les pourcentages de récupération [8].....	31
Tableau 3. Résumé des méthodes utilisées pour détecter BMAA avec les différents réactifs de dérivation.....	33

Liste des sigles et acronymes

ACN	Acétonitrile
AEG	N - (aminoéthyle) glycine
AMPA	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propionique
AQC	6-aminoquinoyl-Nhydroxysuccinimidyl carbamate
BAMA	Aminométhyl- L- alanine
BMAA	β -N-méthylamino-L-alanine
DAB	Acide 2,4-diaminobutyrique
ELISA	Test immuno-enzymatique
ENS	Système nerveux entérique
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	Électronébuliseur (L'ionisation par électro-spray)
FLD	Détecteur en fluorescence
FMOC	9-fluorénylméthylchloroformate
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile
icv	Intracérébroventriculaire
ip	Intrapéritonéal
KOH	Hydroxyde de potassium
LC	Chromatographie liquide
MC	Microcystine
MeOH	Méthanol
MMPB	Acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phénylbutyrique
MS	Spectrométrie de masse
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
OPA	l'O-Phtalaldehyde
PFP	Pentafluoropropionique anhydride
PDC	Parkinsonisme-démence
PEHD	Polyéthylène haute densité
PETG	Polyéthylène téréphtalate modifié par le glycol
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
RPLC	Chromatographie liquide à polarité de phase inverse
sc	Sous-cutané
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
SPE	Extraction sur phase solide
TCA	Acide trichloracétique
TFE	Trifluoroéthanol

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Sébastien Sauvé, pour sa confiance et l'opportunité qu'il m'a donnée de réaliser ces travaux de maîtrise dans son laboratoire. Je le remercie également pour les connaissances qu'il a su partager avec moi et pour sa relecture des travaux.

Je saisis aussi cette occasion pour adresser mes remerciements à mes collègues du laboratoire Sung Vo Duy, Gabriel Munoz et Tuc Dinh Quoc pour leur conseils avisés tout au long de mon projet. Je remercie également Dana Simon (Université de Montréal), ainsi que les nombreux partenaires et collaborateurs qui ont contribué à ce projet.

Je souhaite ensuite adresser mes remerciements au corps professoral et administratif de l'Université de Montréal pour la qualité de l'enseignement offert et le soutien de l'équipe administrative.

Je voudrais enfin exprimer ma reconnaissance envers toute ma famille et mes amis qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de mon parcours académique.

Chapitre 1. Introduction

Les cyanobactéries nommées « algues bleu-vert » sont des micro-organismes photosynthétiques qui existent dans l'environnement et plus précisément dans les milieux aquatiques tels que les eaux douces, saumâtres, estuariennes et marines et les milieux terrestres. Elles peuvent produire plusieurs molécules bioactives, dont les cyanotoxines qui peuvent causer un impact sur la santé des humains et des animaux. Par exemple, sous des conditions spécifiques par exemple, la température de l'eau et la concentration élevée des nutriments (l'azote et le phosphore), la production des microcystines sera favorable [1] [2] [3].

Parmi les grandes familles de métabolites secondaires de cyanobactéries, certains sont toxiques et peuvent être classés selon leur mode d'action :

- (1) Les hépatotoxines sont principalement des microcystines et des nodularines.
- (2) Les alcaloïdes tels que les cylindrospermopsine, les saxitoxines et les anatoxines qui ont des activités et des effets dermatotoxiques et neurotoxiques sur les humains et les animaux. Parmi les alcaloïdes les plus toxiques connus dans l'environnement on trouve notamment la saxitoxine (un des rares alcaloïdes naturels à être classés comme arme chimique).
- (3) Les lipopolysaccharides toxiques, les cytotoxiques et les neurotoxines comme la β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) [2] [3]

1.1 Problématique de la neurotoxine β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA)

Les cyanobactéries peuvent proliférer rapidement en formant des efflorescences et libérer différents métabolites secondaires comme les cyanotoxines. Elles sont les principaux producteurs de la BMAA, également connue sous le nom d'acide alpha-amino-beta-méthylaminopropanoïque. La BMAA est un acide aminé

neurotoxique non protéique de formule brute $C_4H_{10}N_2O_2$ (**figure 1**) et de masse moléculaire 118,13 g/mol. La présence d'un groupe amine et carboxyle dans la molécule permet de former des liaisons peptidiques avec les protéines (formation des chaînes polypeptidiques si elle était mal incorporée). Cet acide aminé est produit par la majorité des isolats de cyanobactéries [4].

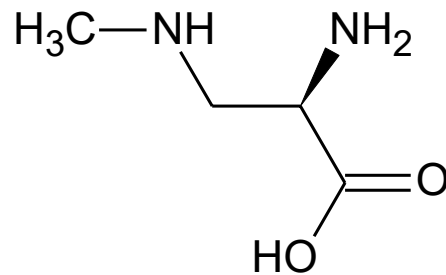


Figure 1 : Structure moléculaire du BMAA

Des publications récentes ont montré que la BMAA détruit les motoneurones à des concentrations de moins de 30 μM par l'activation du récepteur de l'acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propionique (AMPA/kainite) et compromet l'activité des motoneurones à des concentrations de 10 μM par l'activation des récepteurs du glutamate. Chez les individus génétiquement vulnérables, l'exposition au BMAA peut déclencher des maladies neurologiques [4] [5]. La BMAA est généralement produite par les diatomées eucaryotes marines. Elle peut être accumulée dans les tissus cérébraux des humains et des animaux ce qui provoque des lésions neurologiques dans le cerveau et le système nerveux central à des concentrations de l'ordre du μM . La contamination avec cette neurotoxine se produit principalement par l'exposition directe ou par contact indirect par inhalation d'aérosols ou par la consommation des organismes déjà affectés par la BMAA comme les bivalves, les crevettes, les crustacés et les poissons, ainsi que par la consommation des compléments alimentaires contenant des cyanobactéries comme la spiruline [2].

En raison de la bioaccumulation du BMAA, cette neurotoxine a été détectée dans les cycas, les animaux qui se nourrissent de graines de cycas (p. ex., chauves-

souris), ainsi que des peuples autochtones avec des régimes alimentaires traditionnels riches en BMAA (Ile de Guam dans le Pacifique, par exemple). D'ailleurs, la BMAA et ses isomères ont été liés au développement des maladies neurodégénératives du cerveau, telles que la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) [5] [6].

Au début du 21^e siècle, les chercheurs ont éprouvés des difficultés à détecter et à quantifier la BMAA dans les aliments et l'environnement. Par exemple, la faible masse et la polarité de cette molécule compromettent sa réaction en chromatographie de phase inverse C18. Les méthodes par interaction hydrophile ont une faible sensibilité et des limites de détection élevées [7] Par ailleurs l'analyse du BMAA peut présenter d'autres problèmes. La BMAA peut en effet exister sous trois formes ; premièrement, sous forme d'acide aminé libre quand les protéines sont incorporées dans de nouvelles protéines (au cours de la synthèse). Deuxièmement, sous une forme associée à des protéines créant un réservoir de neurotoxine (agrégats de protéines mal repliées dans le cerveau des patients). Troisièmement, elle peut se trouver à l'extérieur des cellules cyanobactéries sous forme de sel, dimère ou carbamate ou liée à des ions métalliques [8].

La BMAA et ses isomères sont devenus un centre d'intérêt au cours des dernières années en tant que facteur environnemental pour les maladies neurodégénératives. Deux de ses isomères, la N - (aminoéthyle) glycine (AEG) et l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB), sont généralement détectés par la plupart des chercheurs et un autre : la aminométhyl- L- alanine (BAMA) est récemment étudié par plusieurs méthodes d'analyse [9]. Les chercheurs ont utilisé différentes techniques analytiques pour l'analyse de cette neurotoxine comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en utilisant le 9-fluorénylméthylchloroformate (FMOC) comme agent de dérivation [8].

1.2 Objectifs du projet

L'élimination des contaminants, des sels et des détergents à partir des échantillons de protéines se fait par la précipitation avec l'acide trichloracétique (TCA), à la suite de la dénaturation des protéines. Le TCA est un acide faible (comparativement à l'acide chlorhydrique). Plusieurs études ont utilisé le TCA dans le but de quantifier les fractions de BMAA libres, solubles et liées par précipitation pour les échantillons solides [10]. Faassen et al. ont confirmé que des échantillons biologiques solides (graines de cycadales, fruits de mer et cladocères) prétraités avec de l'acide trichloracétique (TCA) et de l'acide chlorhydrique (HCl) présentent des concentrations de BMAA plus importantes que celle de la BMAA sous sa forme libre [10]. Lage et al. ont trouvé des taux de récupération plus élevés de BMAA à partir de la poudre de spiruline (*Anthrospira fusiformis*) avec une solution aqueuse de TCA 0,1M, par rapport aux mélanges de solvants sans TCA (par exemple, MeOH/H₂O ou MeOH/acétone) [11].

Le but de cette étude est de quantifier et de confirmer si la BMAA et ses isomères étaient largement présents dans les lacs d'eau douce touchés par des efflorescences cyanobactériennes nuisibles. Dans cette optique, des échantillons (n=390) d'eau de surface prélevés sur le terrain ont été traités par deux méthodes différentes afin d'évaluer l'influence de l'ajout de TCA 0,1M (méthode A : sans TCA ; méthode B : avec TCA).

1.3 structure du mémoire

Le présent mémoire est composé de six chapitres :

Le chapitre 1 présente une introduction générale ainsi que les objectifs du projet.

Le chapitre 2 est une étude bibliographique sur la BMAA retrouvées dans les eaux de surfaces, l'historique de cette neurotoxine, sa toxicité ainsi que les différentes formes de BMAA.

Le chapitre 3 est une revue des techniques d'extraction, de dérivation et d'analyse de BMAA en soulignant l'importance et le taux de récupération de BMAA et ses isomères de chaque méthode.

Le chapitre 4 est une explication de la partie expérimentale de ce projet qui comprend une description de l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la méthode d'analyse et sa validation.

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

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

Chapitre 2. La β -méthylamino- l -alanine (BMAA)

2.1 Historique de la BMAA :

A la fin de l'année 1960, la BMAA a été détectée pour la première fois comme un produit naturel toxique des cyanobactéries sur l'île Pacifique de Guam. Cette première étude focalisait sur les causes des maladies neurologiques (sclérose latérale amyotrophique-parkinsonisme-démence (SLA/PDC) et l'Alzheimer) dans les racines de la plante cycadale *Cycas micronesica* (**figure 2**) en raison de sa mauvaise incorporation dans les protéines [12].



Figure 2 : La plante de cycadale (photo prise par Forest & Kim Starr 16 juillet 2008)

Au cours la même période, les chercheurs ont démontré que la farine de cycas contenait un composant dangereux consommé par les Chamorros à Guam et qui a provoqué des conséquences neuronales dans le cerveau des patients et le taux des décès a augmenté en raison du complexe sclérose latérale amyotrophique-parkinsonisme-démence (SLA/PDC). Cependant, puisque (SLA/PDC) est une maladie à évolution lente, une étude animale a été effectuée sur une période de 27 ans par Spencer et al. en 1987 sur les singes nourris aux aliments riches en BMAA afin de confirmer les effets toxiques et les troubles neurologiques. Ils ont pu en partie

expliquer les causes de la (SLA/PDC) à Guam. En 1986, Spencer et ses collègues ont démontré les effets toxiques du BMAA *in vitro* et *in vivo* à la fois chez les souris et les primates non humains [13]. La BMAA en 2004 a été détectée dans le cerveau des patients canadiens atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui a confirmé qu'il existe d'autres sources de BMAA dans la chaîne alimentaire soit par la consommation des animaux touchés par cette neurotoxine, soit par les cyanobactéries qui sont des symbiotes dans les racines des cycadales (responsable de la production du BMAA) [4] [14]. La BMAA peut également se bioaccumuler dans les fruits de mer et les poissons et la consommation de ces derniers peut potentiellement provoquer des maladies neurodégénératives [15]. La BMAA s'accumule sur les graines de Cycas utilisés pour la fabrication de la farine et aussi consommés par les renards volants (chauves-souris frugivores, *Pteropus mariannus*) et les graines et renard volants font partie de l'alimentation traditionnelle des populations Chamorros à Guam. La BMAA incorporée dans les protéines végétales et animales est donc l'une des principales voies d'exposition de la population de Guam à cette neurotoxine [15].

Le tableau ci-dessous représente un résumé chronologique de différentes recherches et examens pratiqués sur des organismes vivants et les résultats obtenus après l'injection du BMAA. En 1967 le groupe Bell et ses collègues ont été les premiers qui ont réussi à extraire et identifier la BMAA à partir des graines de Cycas [13].

Tableau 1. Les études antérieures effectuées sur des organismes vivant avec la BMAA [13]

Référence	Animaux	Traitement et injection de BMAA	Résultats
<u>Bell et ses collègues</u> à la 5e conférence <u>Cycad en 1967</u> (Whiting, 1988c) [16]	Poussins, 40g	ip, 0,2–0,8 g/kg	Incapacité à étendre les jambes et à se tenir debout
<u>Véga et al. (1968)</u> [17]	Poussins, 45g	ip, 0,3–0,8 g/kg	Incapacité à étendre les jambes et à se tenir debout
	Rats, 60g	ip, 0,7–1,6 g/kg	Démarche traînante, faiblesse et convulsions
<u>Polsky et al. (1972)</u> [18]	Poussins, 45g	ip, 0,4–0,8 g/kg	Incapacité à étendre les jambes et à se tenir debout
	Rats, 66g	ip, 0,8–1,7 g/kg	Démarche traînante, faiblesse et convulsions
	Souris, 35g	ip, 2,5–3,3 g/kg	Démarche traînante, faiblesse et convulsions
<u>Ross et Spencer</u> (1987) [19]	Souris, 37g	icv, 0,3–1 mg	État hyperexcitable, tremblement de tout le corps
<u>Spencer et coll.,</u> <u>1987a , Spencer et</u> <u>coll., 1987b</u> [20] [21]	Singes, 2,3kg	Orale, jusqu'à 12 semaines, 0,1–0,3 g/kg/jour	Trouble du système moteur très similaire à la SLA/PDC
<u>Perry et al. (1989)</u> [22]	Souris, ~30g	Orale, ~ 0,5 g/kg/jour sur 11 semaines	Aucun changement comportemental, neurochimique et neuropathologique
<u>Seawright et</u>	Rats, 85g	ip, 0,5–4 g/kg	Ataxie, difficulté à

<u>al. (1990) [23]</u>			marcher; dommages cérébelleux sélectifs
<u>Smith et Meldrum</u> (1990) [24]	Souris, 23g	icv, 0,08–1,5 mg	Ataxie, roulement, démarche instable, saccades myocloniques
<u>Lindstrom et</u> <u>al. (1990) [25]</u>	Rats, 200g	Intracisternale et dans la substance noire, 0,4 mg	1 semaine après le traitement, en l'absence de déficits neurologiques, des lésions sélectives de la substance noire ont été observées
<u>Rakonczay et</u> <u>al. (1991) [26]</u>	Rats, 250g	icv, 16–60 jours, 0,5 mg/jour	Évasement, rigidité, mouvements saccadés, tremblements du corps ; changements dans le système cholinergique et glutamatergique
<u>Matsuoka et</u> <u>al. (1993) [27]</u>	Rats, 250g	icv, 0,5 mg/jour pendant 10 jours	Évasement, rigidité, mouvements saccadés, tremblements du corps ; implication des récepteurs glutamatergiques
<u>Chang et al. (1993)</u> [28]	Rats, 155g	icv, 1,5 g	Évasement, mouvements latéraux, diminution du nombre de récepteurs glutamatergiques
<u>Dawson et al. (1998)</u> [29]	Rats nouveau- nés	sc, 1 ou 2 injections de 0,1 ou 0,5 g/kg aux jours postnatals 2 et 5	Certains traitements et changements liés au sexe dans la fonction motrice et la

			neurochimie de la moelle épinière non liée à la SLA/PDC
<u>Cruz-Aguado et al. (2006) [30]</u>	Souris, 39g	Orale, 1 mg/jour (28 mg/kg) sur 30 jours	Aucun changement comportemental et neuropathologique
<u>Santiago et al. (2006) [31]</u>	Rats, 320g	Perfusion intrastriatale par microdialyse	Domages apparents des terminaisons dopaminergiques ; on ne sait pas si cela a été causé par BMAA ou non
<u>Buenz et Howe (2007) [32]</u>	Souris, ~30g	Intrastratial, 15,5 µg	Domages spécifiques de l'hippocampe (région CA1) 24 h post-traitement

2.2 Définitions et structures chimique de BMAA et ses isomères

2.2.1 Définition de la BMAA

La BMAA est également connue sous le nom d'acide alpha-amino-bêta-méthylaminopropanoïque [14]. C'est un acide aminé neurotoxique non protéique polaire, relativement stable avec deux groupements fonctionnels (acide carboxylique et amines primaire et secondaire), sa structure ressemble à la structure de l'acide protéinogène alanine (**figure 3**) avec un groupe amino méthylé [5].

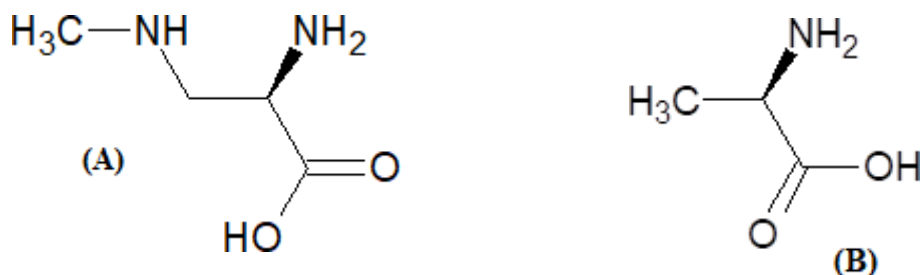


Figure 3 : Structure chimique de (A) BMAA, (B) Alanine

Dans les cyanobactéries, la BMAA est vraisemblablement biosynthétisée à partir de S-sérine et d'ammonium, comme illustré ci-dessous (figure 4).

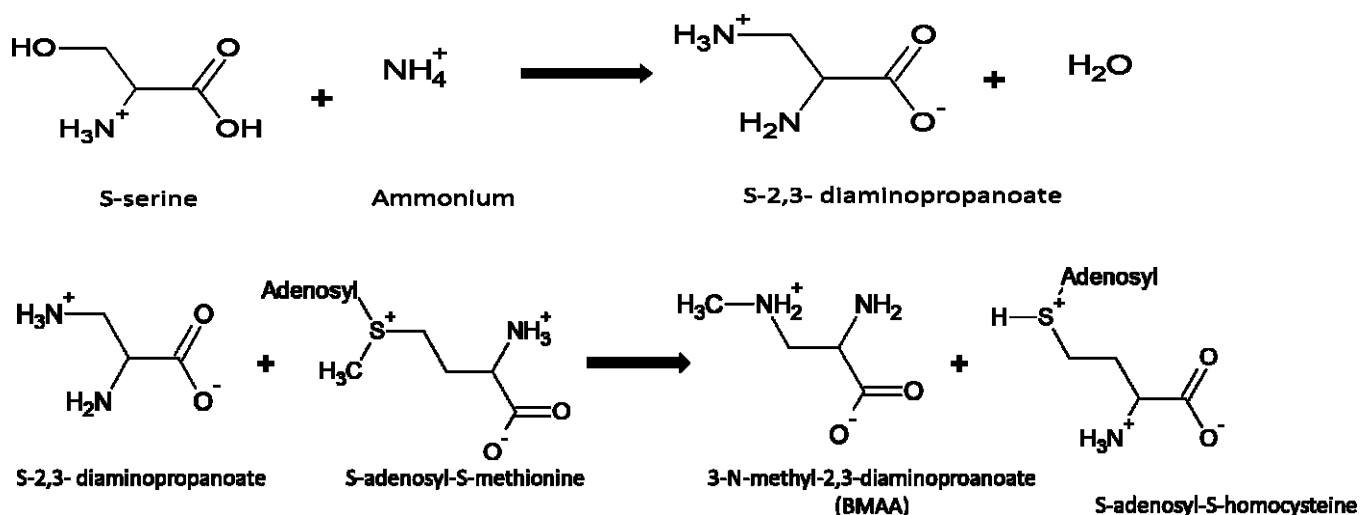


Figure 4 : Voie de biosynthèse du BMAA [33]

2.2.2 Les isomères de BMAA

Théoriquement la BMAA a 260 isomères structuraux, mais sept entre eux sont pertinents au niveau de l'environnement. Notamment, la N-(2-aminoéthyl)glycine (AEG), la β -amino-N-méthylalanine (BAMA) et l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB) peuvent être co-synthétisés par les cyanobactéries ; ainsi, les études au niveau de l'environnement sur la BMAA tendent de plus en plus à inclure la caractérisation des isomères [34].

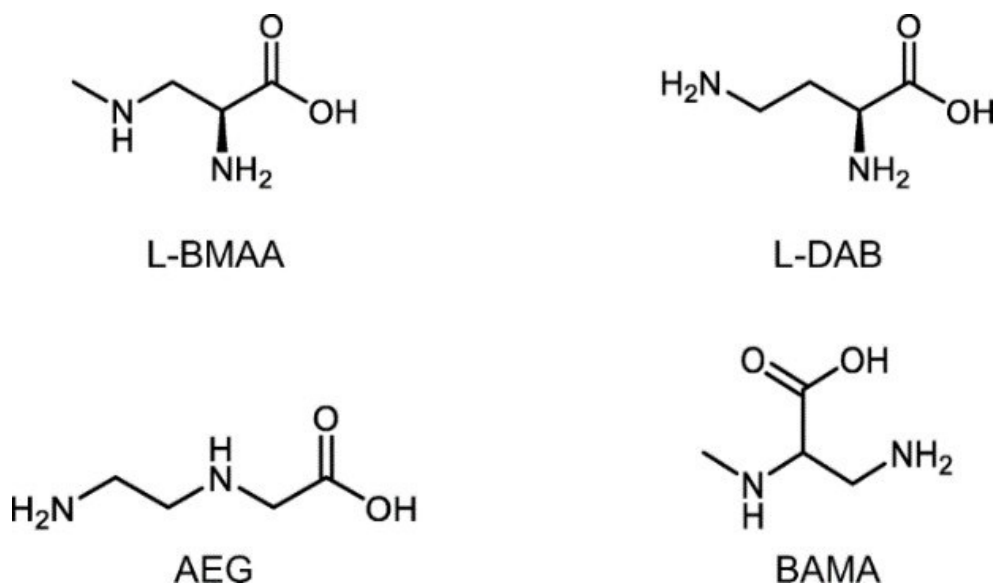


Figure 5 : Structures chimiques de BMAA et ses isomères [35]

Comme la BMAA, le DAB est souvent détecté dans les échantillons de cyanobactéries. Le DAB augmente la toxicité de l' α -flupenthixol et de la pilocarpine chez les rats [36]. L'AEG a été découvert pour la première fois en 1991 [37]. La polymérisation de cette dernière molécule peut former un squelette d'acide peptidique [38] et cet isomère est facile à absorber par l'intestin et donc peut être absorbé rapidement dans la veine porte [39]. Le BAMA est l'isomère le moins toxique, et il est peu analysé par les chercheurs.

2.3 Toxicité de BMAA et ses isomères

Malgré son faible coefficient de partage octanol-eau, la BMAA peut se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire [40]. Généralement elle s'accumule dans certains tissus spécifiques (**figure 6**) et touche diverses espèces aquatiques tels que les moules, les poissons, les huitres et les crustacés. Les impacts de la toxicité de BMAA sur le système nerveux sont ; le mauvais repliement des protéines, la neuro-inflammation et l'inhibition des enzymes spécifiques dans le cerveau. Cette neurotoxine a aussi un effet indésirable sur les neurones du système nerveux

entérique (ENS) du système immunitaire muqueux et éventuellement ciblé les mitochondries si elle touche l'intestin (**figure 6**) [15].

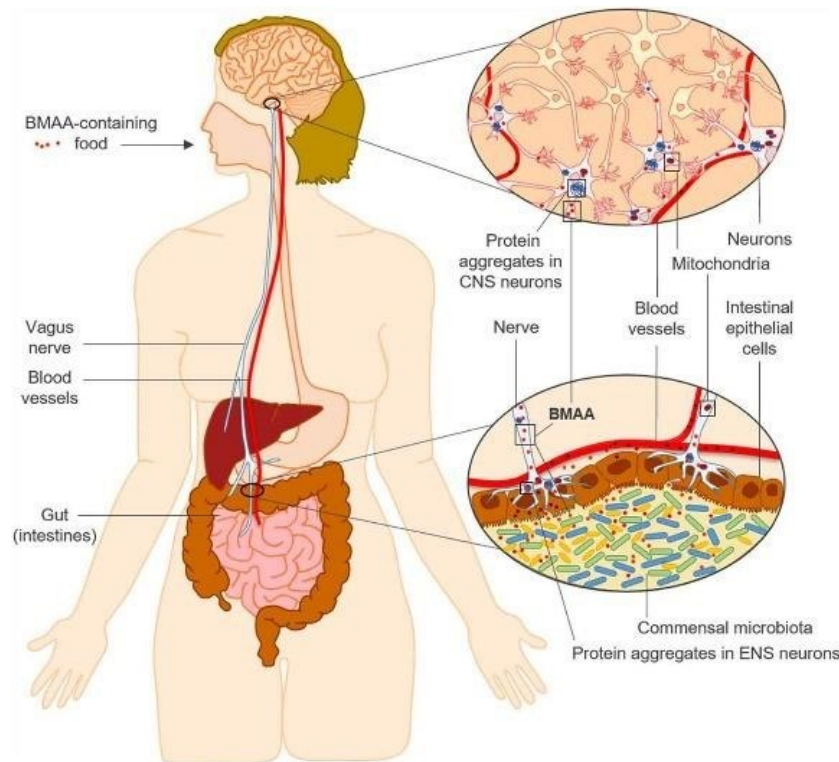


Figure 6 : La pénétration de la β - N -méthylamino-L-alanine (BMAA) dans l'intestin [15].

La contamination intestinale avec la BMAA peut produire principalement des maladies neurologiques, des maladies mitochondriales et des réactions immunitaires chez les patients génétiquement prédisposés, commençant au début dans le système nerveux entérique (ENS) puis dans le système nerveux central (SNC) par le transport par voie rétrograde via les neurones sensoriels via le nerf vague [15].

La BMAA cause des maladies neurodégénératives dans le monde entier, elle présente un risque pour la santé à cause de sa toxicité [41]. Cet acide aminé peut endommager et provoquer la mort des motoneurones par l'activation des récepteurs du glutamate chez les patients génétiquement vulnérables [14] [33].

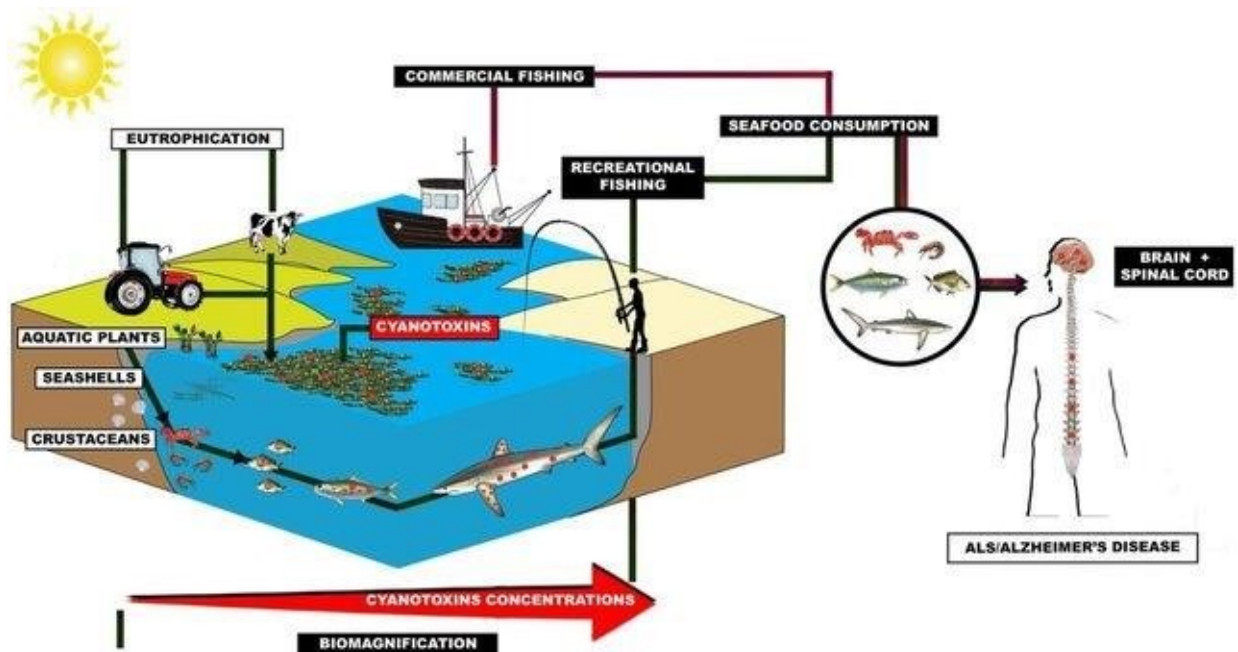


Figure 7 : Schéma explicatif des phénomènes de bioaccumulation, d'eutrophisation et de bioamplification de BMAA dans un réseau trophique marin ainsi que l'effet de cette neurotoxine sur les humains [33]

La toxicité de BMAA et de ses isomères, comme les microcystines et les cyanobactéries, est la cause de divers mécanismes tel que l'incorporation erronée dans les protéines dues à son mauvais repliement suite à l'introduction des acides aminés étrangers au cours de la synthèse [5] [42]. La BMAA peut aussi induire un stress oxydatif par l'introduction et la formation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en raison d'une inhibition du système anti-porteur cystine/glutamate en diminuant les concentrations intracellulaires de glutathion (**figure 8**) [43]. La neurotoxicité du BMAA est la conséquence des modifications de la neurotransmission par l'acétylcholine et le glutamate en raison d'une diminution des récepteurs glutamatergiques. Le glutamate agit sur les récepteurs acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propionique (AMPA), acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA), et les récepteurs kaïnite au niveau de la membrane postsynaptique [44] [45].

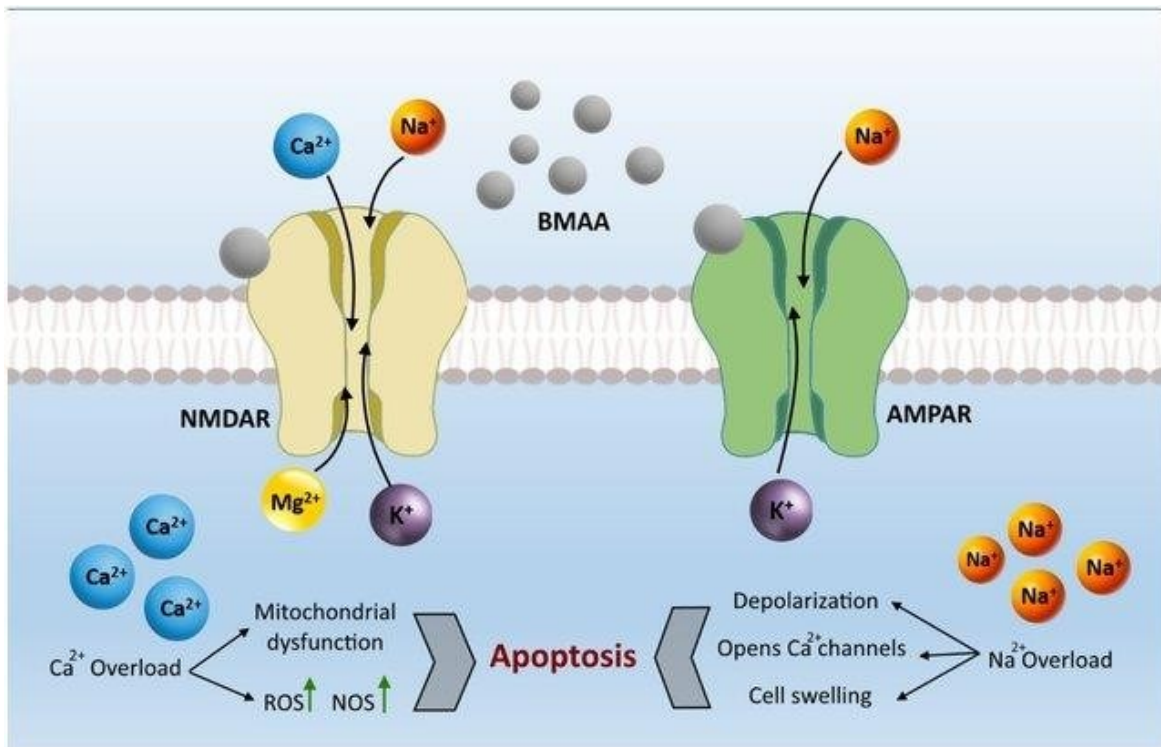


Figure 8 : L'impact de BMAA sur les récepteurs NMDA et AMPA, ce qui provoque des flux migratoires des ions résultants une dépolarisation des neurones, une variation des concentrations de Ca²⁺ intracellulaires, formation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et la mort cellulaire [33].

Cependant, d'autres mécanismes de toxicité du BMAA sont plus directement liés au fait qu'il s'agit d'un acide aminé [42].

2.4 Les différentes formes de BMAA

La BMAA est principalement (95 %) formée par les cyanobactéries y compris les Nostocs, qui vivent en tant que symbiotes dans les racines du Cycas (**figure 9**) et qui sont utilisées dans la production de la farine de Cycas consommée par le peuple Chamorro [46] [47].

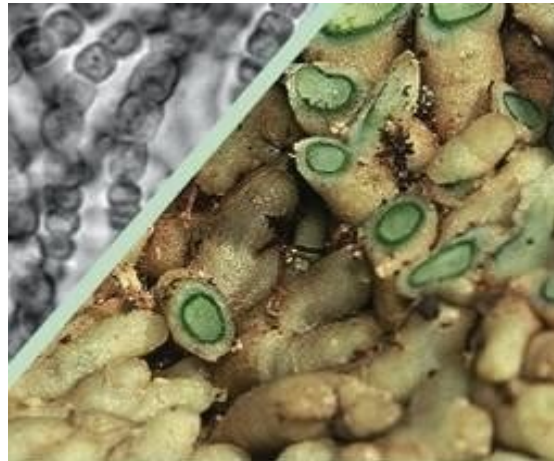


Figure 9 : La BMAA apparait comme une doublure verte dans les racines du Cycas [46]

La BMAA existe non seulement sous forme d'acide aminé libre, mais aussi sous une forme associée aux protéines, ce qui provoque la formation d'un réservoir de neurotoxine, transmis entre les maillons trophiques du réseau trophique de Guam (**figure 10**) [43] [48].

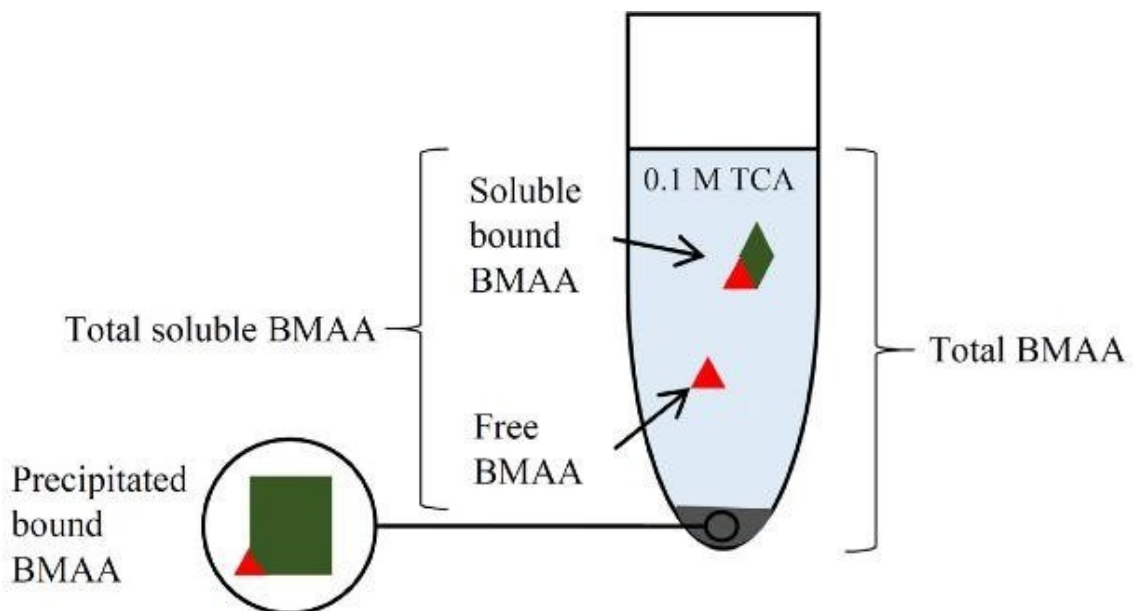


Figure 10: Les différentes formes de BMAA. Les BMAA libres et solubles se trouvent dans l'extrait d'acide trichloroacétique (TCA). La BMAA totale est la somme des trois formes [10].

- BMAA libre :

Au cours de la synthèse, quand les protéines sont dégradées et incorporées dans des nouvelles protéines, la BMAA se trouve sous sa forme libre, sachant qu'elle est la plus souvent facile à détecter dans l'environnement, car son extraction se fait avec les solvants polaires [43].

- BMAA soluble / liée aux protéines :

On trouve aussi la BMAA liée à des composés inconnus dans une solution ce qui favorise la formation du complexe BMAA-molécule de faible masse moléculaire, pour pouvoir extraire ce type de BMAA il faut procéder à une étape d'hydrolyse acide [49].

- BMAA précipitée :

Certains BMAA peuvent être liés à des protéines de poids moléculaires importants, et peut donc se retrouver comme un précipité dans la matrice [49].

À Guam, on observe des facteurs de bioamplification de la BMAA de 50 fois et 10 000 fois pour la forme liée et libre dans la chaîne alimentaire [40].

Chapitre 3. Les méthodes analytiques

La BMAA est généralement présente des faibles concentrations dans les cyanobactéries libres (ng g^{-1} à $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec) [50] [51] [52] [53] [54] et des concentrations beaucoup plus faibles dans les eaux de surface (extracellulaire dissous, ng L^{-1} à $\mu\text{g L}^{-1}$) [9] [53] [55] [56]. Cela implique que la BMAA et ses isomères peuvent échapper à la détection dans les eaux de surface. En outre, peu d'études ont ciblé les eaux de surface pour la surveillance de la BMAA, par rapport aux échantillons biologiques [50].

L'analyse des traces de BMAA est compliquée, comme le décrivent plusieurs études [7] [8] [54]. La réévaluation de méthodes d'analyse préexistantes a également démontré le potentiel de défaillances en matière de contrôle et assurance qualité (QA/QC) [57] [58]. La séparation chromatographique de la BMAA et de ses isomères est difficile (AEG, BAMA et DAB). Par exemple, Roy-Lachapelle et al. [56] ont montré que l'AEG, la BMAA et le DAB dissous pouvaient subir des pertes importantes (>60 %) avec certains types de matériaux de filtration, y compris les filtres en fibre de verre (GFF). En tant qu'acide aminé basique, la BMAA peut également s'absorber à la surface d'autres matériaux de verrerie [7], ce qui peut entraîner une sous-estimation (diminution) des concentrations. Il existe également des cas où une surestimation (augmentation) peut être observée. Faassen et al. [57] ont évalué un test immuno-enzymatique (ELISA) commercial et ont montré que la trousse n'était pas adaptée au dépistage de la BMAA dans les eaux de surface. Le taux de récupération a atteint 400 % dans les échantillons enrichis et la trousse ELISA a donné des résultats positifs pour la BMAA dans presque tous les échantillons prélevés sur le terrain (max. $300 \mu\text{g L}^{-1}$ pour l'eau de l'étang), ce qui est en contradiction avec l'absence de détection dans les échantillons analysés par LC-MS/MS [57]. Un problème similaire a été récemment noté par Zhang et al. [64] lors de l'analyse de la BMAA dans les eaux de ruissellement par les deux techniques d'analyse. Les résultats faussement positifs

parfois obtenus avec ELISA dans les eaux naturelles [57] [59] et d'autres matrices complexes [60] sont probablement dus à des interférences avec les composants de la matrice co-occurrents, qui répondent avec l'ELISA. Une revue critique de la littérature sur la BMAA a également relevé de graves lacunes dans la validation et la communication des procédures analytiques [51]. L'utilisation de méthodes d'analyse inadaptées ou insuffisamment documentées peut expliquer en partie la controverse sur la BMAA, c'est-à-dire l'absence actuelle de consensus sur la présence généralisée de la BMAA dans les écosystèmes aquatiques [7] [51].

3.1 Les méthodes déjà utilisées pour l'analyse du BMAA

Au cours des dernières décennies, plus de 350 études ont été réalisées afin d'identifier et d'extraire la BMAA et ses isomères dans différentes matrices à cause de sa toxicité dans les écosystèmes terrestres et aquatiques dans le monde entier. Les chimistes analytiques ont eu du mal à développer une méthode adéquate pour quantifier la BMAA dans les échantillons environnementaux et alimentaires, ceci est dû aux différentes formes de BMAA que l'on peut trouver dans l'environnement (forme libre, liée aux protéines et soluble) [8] [35] [61] .

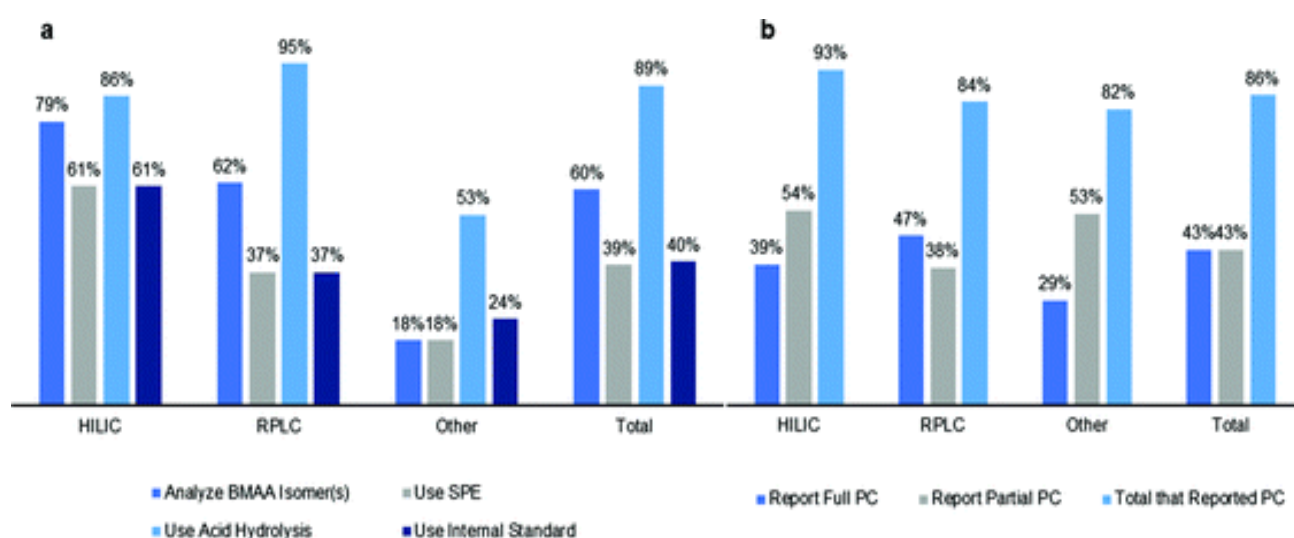


Figure 11 : L'efficacité des différentes méthodes analytiques (le pourcentage d'études pour chaque méthode) [8].

L'histogramme ci-dessus présente (a) les méthodes de séparation et d'analyse de BMAA et ses isomères, (b) le rapport des caractéristiques de performance (PC) entre les différentes méthodes (les recherches ont été effectuées en 2019) [8].

Depuis la découverte de BMAA et ses isomères jusqu'à 2019, les chercheurs ont essayé de développer une méthode plus efficace afin d'avoir un pourcentage de récupération plus important (**tableau 2**), parmi les méthodes les plus fréquemment utilisées, la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) et la chromatographie liquide à polarité de phase inverse (RPLC). Environ 79 % des études ont été effectuées avec HILIC (79 % de ces méthodes ont utilisé la SPE comme une étape d'extraction) et 62 % avec RPLC (dont 37 % ont utilisé la SPE) (**figure 11**) [8].

Comme la BMAA existe sous 3 formes, selon la littérature, la BMAA libre est la plus analysée, pour les deux autres formes il faut utiliser une étape d'hydrolyse afin de libérer les protéines associées au BMAA, 89 % et 95 % des méthodes ont utilisé l'hydrolyse acide pour l'identification par HILIC et RPLC respectivement [8].

Tableau 2. Résumé des méthodes de séparation du BMAA et ses isomères avec les pourcentages de récupération [8]

Type de la méthode	Type de séparation	Dérivé	Matrice	Isomères entièrement séparés	% de Récupération de BMAA	LD
HILIC	ZIC-HILIC	Rien	Animal (fruit de mer)	BMAA, AEG, DAB	86 -110 % (total)	2 ng mL ⁻¹
			Cerveau	BMAA, AEG, DAB	82 - 84 %	2 ng mL ⁻¹
			Cyanobactéries	BMAA, AEG, DAB	7 - 78 %	2 ng mL ⁻¹
	Waters Acquity BEH amide		Moule	BMAA, AEG, DAB	99 -105 %	2 ng mL ⁻¹

	TSKgel amide-80		Moule, cycas, cyanobactéries	BMAA, AEG, DAB, BAMA	Non rapporté	0,4 ngmL ⁻¹
RPLC	Eau Acquity C18 BEH	CAQ	Cyanobactéries	BMAA, AEG, DAB,	105 - 108 %	0,187 ngmL ⁻¹
	Phenomenex AAA-MS 250	PCF	Cyanobactéries	BAMA, DAB	87.9 - 98.9 %	5 ngmL ⁻¹
	Eau Acquity C18 BEH	Chlorure de dansyle	Moule	BMAA, AEG, DAB,	83 %	0,05 ngmL ⁻¹
Autres	Trousse ELISA	Rien	Poisson, bassin d'eau contaminé	BMAA	70 - 83 %	5 ngmL ⁻¹
	Électrophorèse capillaire		Moule, cycas, homard, cyanobactéries	BMAA, AEG, DAB, BAMA	Non rapporté	0,8 ngmL ⁻¹

3.2 Les méthodes de préparation des échantillons

3.2.1 Dérivation des échantillons

L'avantage de l'ajout d'un agent de dérivation pour l'identification du BMAA est d'augmenter le poids moléculaire de BMAA et ses isomères, augmenter la rétention en chromatographie liquide en phase inverse RPLC et de diminuer l'exposition au bruit de fond chimique (résolution plus importante, moins d'interférences) [62].

Depuis les années 1980, plusieurs agents de dérivation ont été développés tels que l'O-Phtalaldehyde (OPA), le 6-aminoquinoly-N Hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), le chlorure de 9-fluorénylméthylchloroformate (FMOC-Cl) et l'éthylchloroformiate [35]. En 1988, le FMOC a été utilisé pour la première fois comme un agent de dérivation pour l'analyse de BMAA avec la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC). Parmi les premières méthodes de séparation

utilisées au cours de la même période la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

D'autres agents de dérivation sont testés avec des méthodes spécifiques tels que le propylchloroformate (PCF) dans la méthode EZ:faast avec détection MS, la ninhydrine (dérivation post-colonne) avec détection par fluorescence [35]. De plus, le 6-aminoquinoyl-Nhydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) est souvent utilisé en chromatographie liquide avec un détecteur en fluorescence (LC-FLD) pour les analyses du BMAA dans les extraits de cyanobactéries dans les échantillons de renards volants [35] [63] [64]. Principalement les analyses effectuées avec AQC sont pour les échantillons biologiques basées sur des réactions des amines primaires et secondaires. Cependant, dans la littérature, les résultats de la quantification du BMAA après dérivation ont été positifs pour l'utilisation de RPLC-MS/MS et négatifs lorsque qu'une approche par HILIC-MS/MS était utilisée (**tableau 3**) [62].

Tableau 3. Résumé des méthodes utilisées pour détecter BMAA avec les différents réactifs de dérivation.

Référence	Méthode	Analyte	Matrice	Agent de dérivation
<u>Kisby et al., 1988</u> [65]	HPLC	BMAA	Graines de cycadales	FMOC
			Tissu animal	
<u>Duncan et al., 1989</u> [66]	GC-MS	BMAA	Graines de cycadales	Pentafluoropropionic anhydride (PFPA) et Trifluoroethanol (TFE)
<u>Banack et al., 2007</u> [5]	HPLC-FLD	BMAA	Cyanobactéries	AQC
	UPLC-UV			
	LC-MS/MS			
	Analyseur d'acides aminés			
<u>Kubo et al., 2008</u> [67]	LC-ESI-MS	BMAA	Cyanobactéries	Sans dérivation

<u>Rosén and Hellenäs, 2008 [68]</u>	LC-MS/MS	BMAA DAB	Graines de cycadales	AQC
			Cyanobactéries	
<u>Metcalf et al., 2008 [69]</u>	HPLC-FLD	BMAA	Cyanobactéries	AQC
	LC-MS/MS			
<u>Pablo et al., 2009 [47]</u>	HPLC-FLD	BMAA	Tissu cérébral	AQC
	LC-MS/MS			
<u>Eriksson and Jonasson, 2009 [70]</u>	HPLC-FLD	BMAA	Cyanobactéries	AQC
<u>Cox et al., 2009 [71]</u>	HPLC-FLD	BMAA DAB	Croûte de sol séchée dans le désert	AQC
	Analyseur d'acides aminés			
	Triple quadripôle LC-MS/MS			
<u>Moura et al., 2009 [72]</u>	RMN ¹ H	BMAA	Échantillons aqueux	Sans dérivation
			Cerveau d'une souris	
			Efflorescences algales	
<u>Scott et al., 2009 [73]</u>	LC-FLD	BMAA	Eau	FMOC
			Tissus de poissons	
			Compléments alimentaires	
<u>Faassen et al., 2009 [74]</u>	LC-MS/MS	BMAA DAB	Écume bleue	Sans dérivation
<u>Li et al., 2010 [75]</u>	LC-ESI-MS	BMAA	Cyanobactéries	AQC
	LC-ESI-MS/MS			

<u>Spáčil et al., 2010</u> [76]	HPLC-MS/MS SRM	BMAA DABA	Cyanobactéries	AQC
<u>Krüger et al., 2010</u> [77]	LC-MS/MS	BMAA	Cyanobactéries	Sans dérivation
		DAB	Graines de cycadales	
<u>Banack et al., 2010</u> [78]	HPLC-FLD	BMAA	Échantillons biologiques	AQC
	UPLC-UV	DAB		
	LC-MS/MS			
<u>Banack et al., 2011</u> [79]	HPLC-FLD	BMAA	Cyanobactéries	AQC
	UHPLC- MS/MS			
	UPLC-UV			
	UPLC-MS			
<u>Esterhuizen-Londt and Downing, 2011</u> [80]	LC-MS	BMAA	Cyanobactéries	EZ:faast™
<u>Faassen et al., 2012</u> [81]	HPLC-FLD	BMAA	Cyanobactéries Graines de cycadales (sarcotesta)	AQC
	LC-MS/MS (Sans dérivation)			
	LC-MS/MS (Avec dérivation)			
<u>Muñoz-Sáez et al.</u> (2015) [82]	Électrophorèse et Western blot	BMAA	Cerveau d'une souris	Sans dérivation
<u>Lage et al. (2016)</u> [11]	LC-MS/MS	BMAA	Cyanobactéries	AQC

<u>Metcalf et al. (2017)</u> [83]	UPLC-MS/MS	BMAA	Cyanobactéries Graines de cycadales Fruits de mer	AQC
<u>Main et al. (2018)</u> [3]	LC-MS/MS	BMAA DAB	Cyanobactéries	chloroformiate de propyle
<u>Vo Duy et al. (2019)</u> [61]	UPLC-MS/MS	BMAA DAB AEG BAMA	Eau de surface	FMOC

L'utilisation du FMOC en tant qu'agent de dérivation pour l'analyse du BMAA a été effectuée pour la première fois en 1980 par Kisby et al. FMOC est reconnu comme l'agent de dérivation le moins toxique [84]. Ci-dessous sont illustrées les réactions de dérivation du BMAA et de ses isomères en ajoutant le FMOC-Cl.

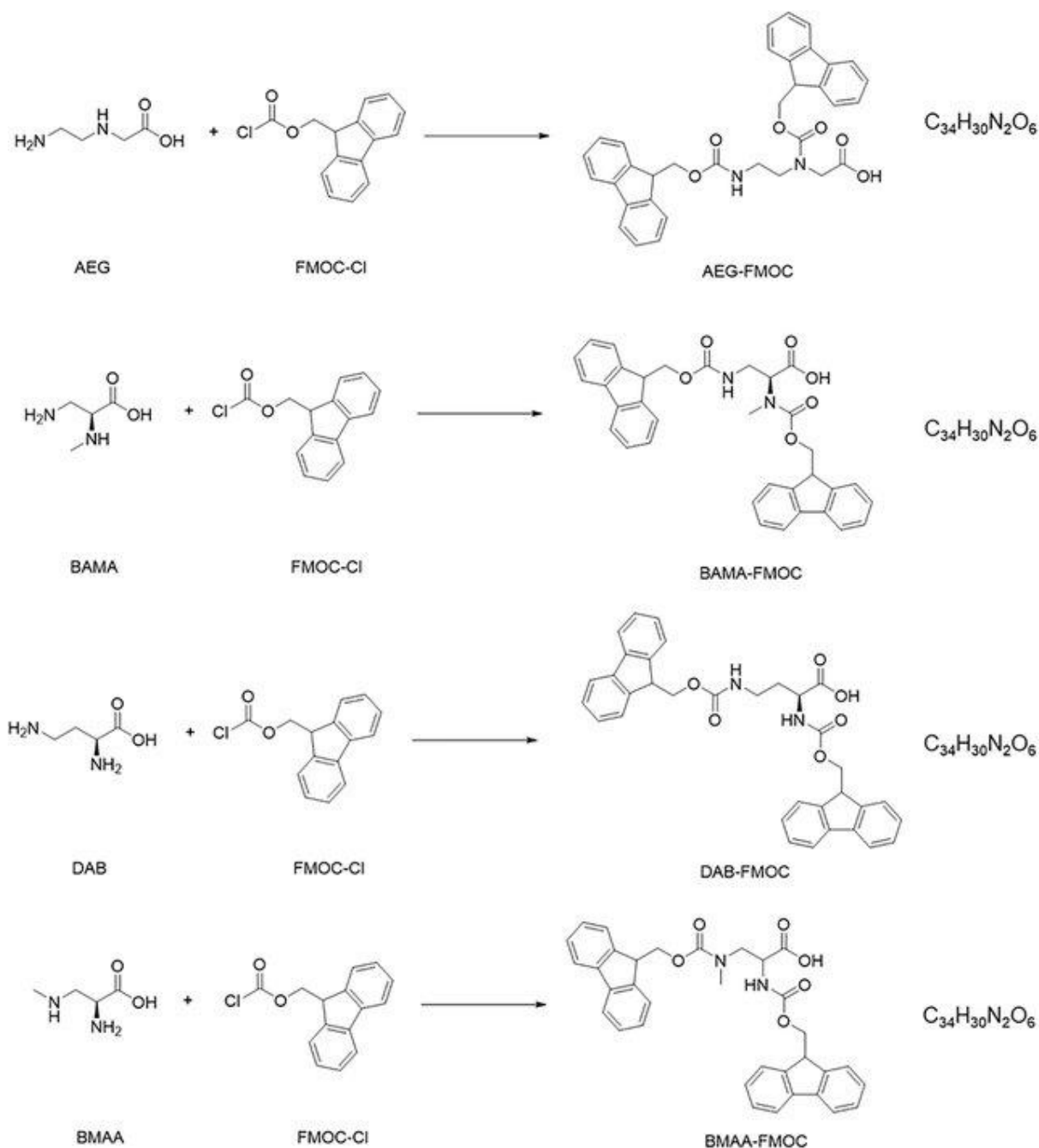


Figure 12 : Les réactions de dérivations de BMAA et ses isomères

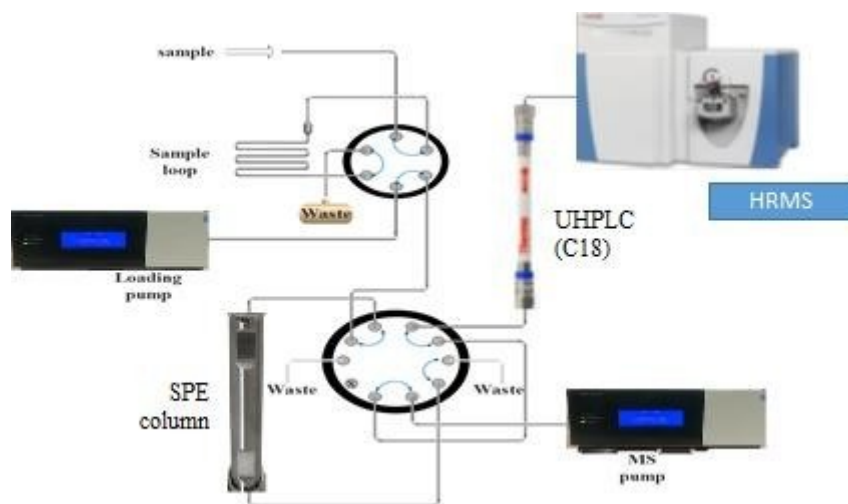
3.2.2 L'extraction de BMAA

La BMAA a été détecté dans les écosystèmes aquatiques et terrestres dans plusieurs pays, différentes études ont été effectuées afin d'extraire cette neurotoxine et ses isomères. Parmi les techniques d'extraction les plus utilisées pour l'identification du BMAA, on peut citer quelques approches. La plupart des études sont basées sur une méthode basée sur la précipitation des protéines à l'aide d'un

solvant organique tel que l'acide trichloracétique (TCA). C'est une méthode rapide et peu coûteuse, il est nécessaire d'effectuer aussi une étape d'hydrolyse acide afin d'extraire la BMAA liée [11] [64]. La deuxième méthode d'identification est l'extraction sur phase solide par échange de cations pour éliminer les composés interférents résiduels.

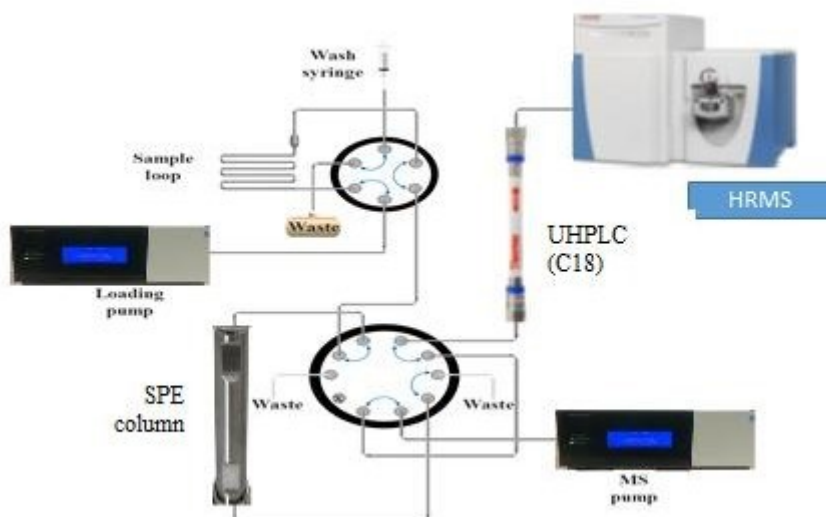
Dans cette étude on a utilisé l'extraction sur phase solide (SPE) en ligne. L'intérêt de l'utilisation de la SPE en ligne est d'éliminer les étapes d'évaporation et de reconstitution, de consommer un faible volume d'échantillon, ainsi qu'un fonctionnement simple et rapide qui diminue les risques de contamination de l'échantillon et des pertes d'analytes et permet ainsi une meilleure précision et reproductibilité analytique [85] [86].

Le principe de fonctionnement de la SPE en ligne est le suivant ; la première étape est le chargement de l'échantillon dans la colonne d'extraction (la colonne de préconcentration), ensuite, l'étape du transfert des analytes en mode black-flush en mettant en ligne la colonne de préconcentration avec la phase d'élution vers la colonne analytique suivie de la détection par la spectrométrie de masse [86] [87]. La figure ci-dessous (**figure 13**) explique le principe de couplage de la SPE en ligne avec HPLC. Le couplage de la SPE en ligne avec la séparation ultrarapide UPLC sert aussi à augmenter le débit de l'échantillon ce qui réduit le temps d'analyse [86]. En contrepartie, le seul inconvénient de l'utilisation de cette méthode c'est le faible contrôle des paramètres d'élution.



1.

Étape d'injection



2.

Étape de chargement

La spectrométrie de masse joue aujourd'hui un rôle important dans les études de pollution de l'environnement et de dopage grâce à sa sensibilité, sa sélectivité et sa possibilité de faire des analyses quantitatives rapides. En effet, la SM est constituée principalement par quatre composants ; un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ionisation ou chambre d'ionisation, un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur ratio m/z et un détecteur pour transformer les ions en signal électrique et un système de traitement.

Dans cette étude, on a utilisé l'ionisation par l'électronébulisation (*electrospray-ESI*). C'est une technique d'ionisation douce qui permet de transférer et ioniser les molécules d'un échantillon qui dissoutes dans une phase liquide vers en phase gazeuse. Le principe de l'ESI (**figure 14**) (processus d'ionisation en mode positif) consiste à appliquer un champ électrique entre le nébuliseur et une contre électrode, l'échantillon est pulvérisé sous forme de gouttelettes du fait des fortes répulsions coulombiennes entre les charges de même signe. Par la suite, le solvant est évaporé par l'action d'un gaz neutre (N_2), diminuant la taille des gouttelettes jusqu'à obtention d'une molécule multichargée [88]. La figure 15 ci-dessous résume le principe de fonctionnement d'ESI.

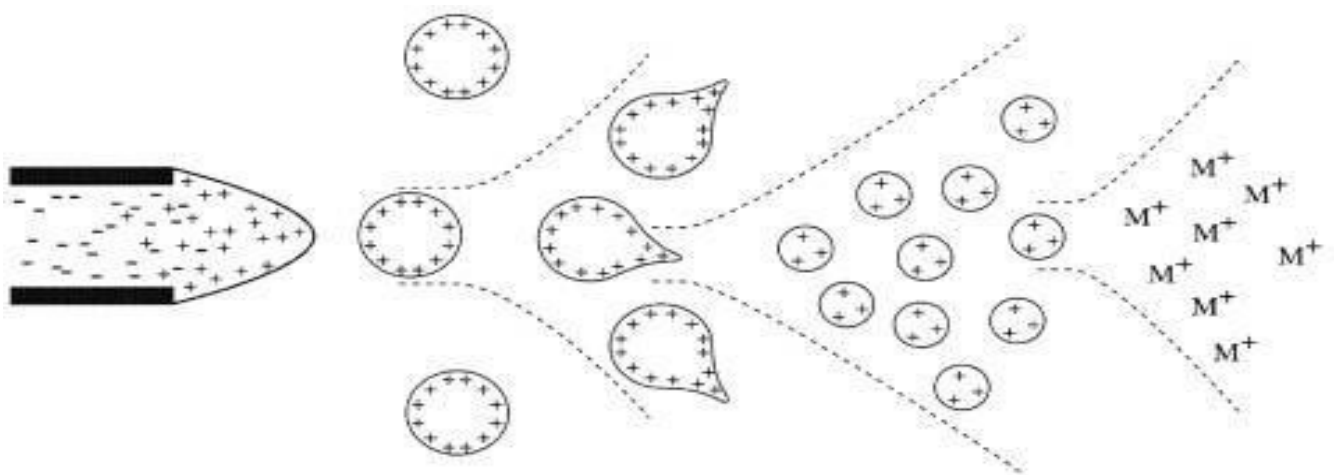


Figure 14 : Le principe d'ionisation par électronébulisation (*electrospray -ESI*) [89].

Finally, the molecules are directed towards the mass spectrometer. The quantification of analytes was done using Orbitrap. This type of high-resolution mass analyzer was introduced in 2000 by Makarov [90]; it is composed mainly of two electrodes, a central coaxial electrode through which the ions oscillate periodically (orbital motion) and an external cylindrical electrode. The current due to the ion motion is detected by a detector and the corresponding image current is analyzed by Fourier transformation to create high-resolution mass spectra.

The trapped ions are then sent, collected in a C-trap and finally injected into the Orbitrap mass analyzer (known for its small size). In particular, the Q Exactive, also called the Exactive Quadrupole (**figure 15**). The Q Exactive is a hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific Q Exactive), this tool is generally used for quantification and detection of molecules in complex matrices thanks to its combination of the efficiency of a quadrupole for selection and measurement of the m/z ratio of precursor ions with the Orbitrap high-resolution and accurate mass detection, the latter is composed of an ion source (1), focusing lenses (2), a quadrupole (3), a C-trap (4), a collision cell (5) and an Orbitrap (6) [91].

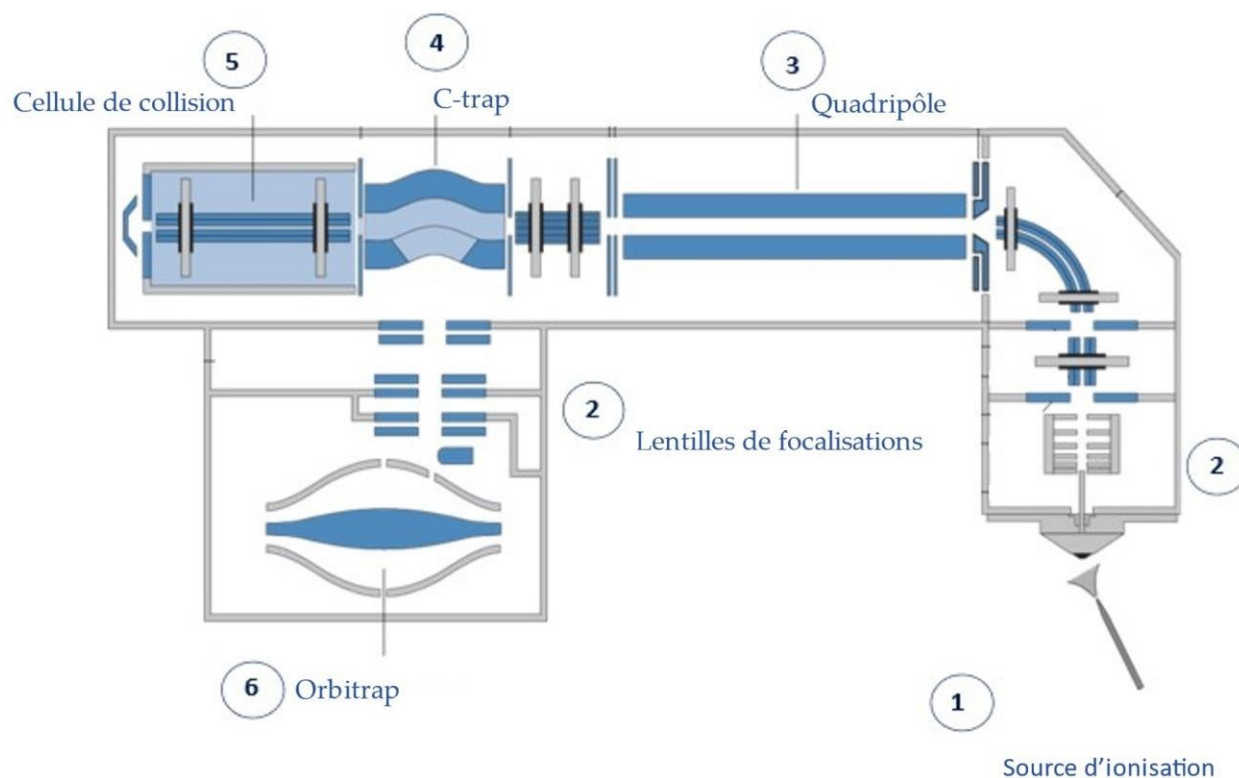


Figure 15 : Schéma d'un appareil Q-Exactive [90]

Les ions introduits par la chambre d'ionisation, passent vers une lentille de focalisation puis à travers un guide de faisceau actif avancé, les ions sont dirigés vers le quadripôle qui permet de filtrer les ions selon leurs ratio m/z . Les ions sont ensuite piégés dans le C-trap et ils perdent leur énergie cinétique suite à des collisions avec un gaz (N₂). Ensuite, les ions passent dans la cellule de collision, souvent constituée par un multipôle à l'intérieur d'un tube métallique, dans laquelle les spectres de fragments produits seront finalement détectés dans l'Orbitrap.

Chapitre 4. Partie Expérimentale

4.1 Échantillonnage de l'eau de surface

Des échantillons d'eaux de surface (n=390) ont été collectés entre 2016 et 2021 de 45 sites au Brésil, au Canada (dans les provinces de l'Ontario, du Québec et de la Saskatchewan), en France, au Mexique et au Royaume-Uni. Leur répartition géographique est illustrée à la figure 17. Plusieurs de ces sites correspondent à des lacs intérieurs d'eau douce ayant des historiques prouvés de proliférations nocives de cyanobactéries [92] [93] [94]. L'échantillonnage a été effectué dans le cadre du projet ATRAPP par du personnel universitaire et des partenaires formés. D'autres échantillons d'eau provenant des lacs touchés par les efflorescences ont été obtenus dans le cadre d'un projet scientifique (Adopte un lac) [95]. Les échantillons d'eau de surface pour l'analyse des cyanotoxines ont été recueillis dans des bouteilles ambrées de 125 mL en polyéthylène téréphtalate modifié par le glycol (PETG), préalablement lavées au laboratoire et rincées in situ trois fois avec l'eau de surface du site. Les échantillons ont été conservés à 4°C et expédiés dans les 1 à 3 jours suivant leur collecte au laboratoire où ils ont subi trois cycles de lyse cellulaire (3 cycles de gel-dégel) et filtrés sur des filtres à membrane en nitrocellulose (0,2 µm) avant d'être stockés à -20°C [96] jusqu'à leur préparation et leur analyse.

En outre, des bouteilles en polyéthylène haute densité (PEHD) de 500 mL (opaques, lavées à l'acide) ont été collectées simultanément pour l'analyse des paramètres auxiliaires des eaux de surface, tels que les nutriments et la chlorophylle-a, filtrées et stockées à 4°C jusqu'à l'analyse. Les analyses de la chimie des nutriments ont été effectuées au *Global Institute for Water Security* de l'Université de Saskatchewan (Saskatoon, Canada) ou au Département des sciences biologiques de l'Université de Montréal (Montréal, Canada) en utilisant les méthodes standard de l'EPA (*US Environmental Protection Agency*).

Les analyses taxonomiques ont été effectuées chez Water's Edge Scientific LLC (Baraboo, WI, USA). Les échantillons conservés ont été analysés selon la méthode APHA 10200F (APHA, 2012) et le comptage cellulaire a été effectué dans une chambre de comptage Sedgewick-Rafter.

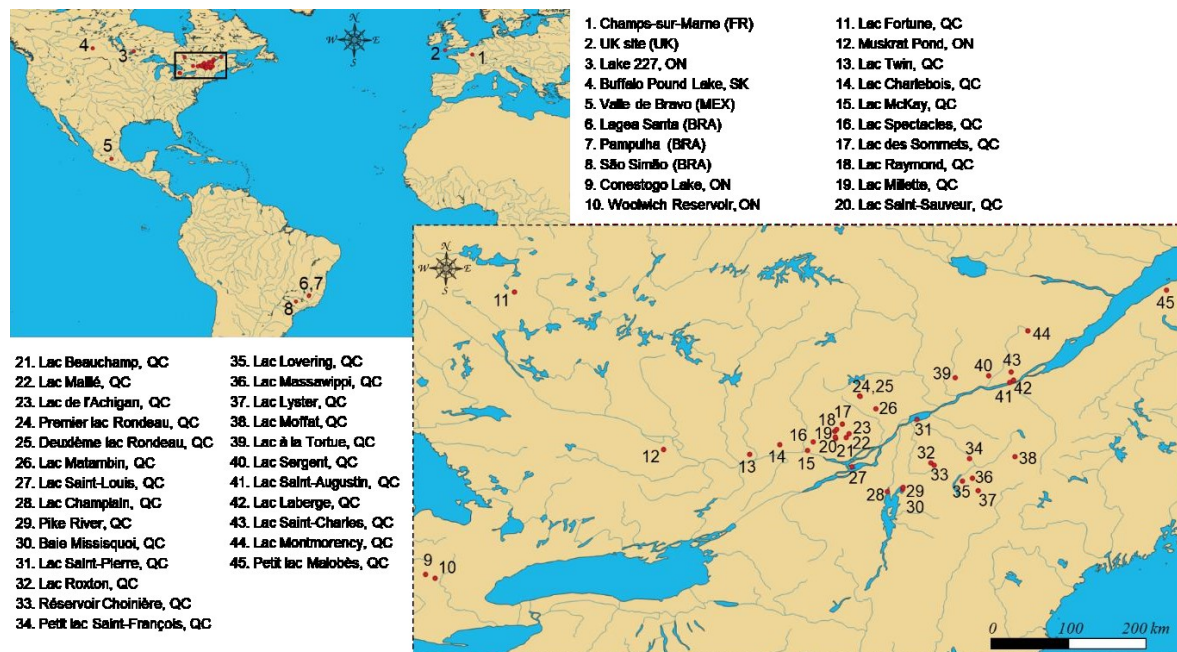


Figure 16 : Emplacement géographique des 45 sites d'échantillonnage contrôlés dans la présente étude, y compris les eaux de surface intérieures du Brésil (BRA), du Canada (Ontario (ON), Québec (QC) et Saskatchewan (SK)), de la France (FR), du Mexique (MEX) et du Royaume-Uni (UK). L'échantillonnage a été effectué à différents endroits dans certains lacs pour tenir compte des variations locales des CyanoHAB (p. ex., sites 4, 5, 9, 30, 28 et 34), des différentes profondeurs de la colonne d'eau (p. ex., site 4) ou des différents jours pendant l'échantillonnage saisonnier à haute intensité (p. ex., sites 4 et 34), ce qui a donné un nombre total de $n = 390$ échantillons d'eau environnementale à analyser.

4.2 Préparation des échantillons

L'analyse des échantillons d'eau de surface par la méthode B (avec TCA) a été réalisée comme suit. Une portion aliquote de 5 mL d'eau de surface filtrée sur une membrane de nitrocellulose a été dopée avec l'étalon interne marqué aux isotopes (ILIS : BMAA-d3) pour obtenir une concentration initiale de 500 ng L^{-1} . Le TCA a été

ajouté pour atteindre une concentration de 0,1M [10] [69] suivi d'un temps d'attente de 10 minutes. La solution a été ajustée à un pH quasi-neutre avec l'hydroxyde de potassium (KOH) puis l'addition de solutions tampons de borate (0,3 mL d'une solution 100mM) et de citrate (0,3 mL d'une solution 150mM) pour atteindre le pH 9. Le mélange a été vortexé pendant 10 secondes (3200 rpm) suivi d'un temps d'attente de 5 minutes. FMOCl a été ajouté aux échantillons (300 μ L d'une solution de 3 mg mL⁻¹ préparée dans de l'ACN) et la réaction de dérivation s'est poursuivie pendant 1 h sous agitation (200 rpm, agitateur de four de laboratoire ; 65 °C ; sans lumière). Les échantillons ont refroidis à température ambiante et un solvant organique (300 μ L de MeOH) a ensuite été ajouté pour stopper la réaction et minimiser les pertes de sorption des acides aminés dérivés avec le groupement hydrophobe FMOCl [61]. Enfin, les échantillons ont été mélangés avec un vortex (10s ; 3200 rpm) et centrifugés (10 min ; 6000 rpm) avant de prélever le surnageant dans un flacon LC-MS de 2 mL.

Un sous-ensemble d'échantillons d'eau de surface (n=158) a également été analysé par la méthode A (sans ajout de TCA) [61]. Ces échantillons ont été dopés avec du BMAA-d3 (500 ng L⁻¹), mélangés avec des tampons de borate et de citrate, et dérivés avec du FMOCl comme décrit précédemment.

4.3 Analyse instrumentale

D'abord, les échantillons dérivés ont été analysés par extraction en phase solide en ligne (SPE en ligne) couplée à une chromatographie liquide à ultra-haute performance avec spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS), inspirée de l'article de Vo Duy et al. [61] avec quelques modifications. Ensuite, l'injection a été réalisée à l'aide d'un échantillonneur automatique PAL RTC (Zwingen, Suisse) et d'une boucle en acier inoxydable de 1 mL (SST). Le volume d'injection a été fixé à 1 mL. Par ailleurs, l'enrichissement en ligne a été réalisé à l'aide d'une pompe Thermo Dionex UltiMate™ 3400 SD et d'une colonne Thermo HyperSep Retain PEP (équilibre hydrophile lipophile, 20 mm x 2,1 mm, taille des

particules 40-60 μm). Le débit de chargement a été réglé à 1,500 $\mu\text{L min}^{-1}$. Après le chargement de l'échantillon, on a laissé la phase mobile aqueuse en ligne (eau HPLC) s'écouler 2 mL supplémentaires pour éliminer les sels.

Les analytes testés ont ensuite été élués à 450 $\mu\text{L min}^{-1}$ en mode rétroélution avec la phase mobile analytique (A : 2,5 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ dans l'eau HPLC ; B : ACN), à l'aide d'une pompe Thermo Dionex UltiMate™ 3400 RS. Pour la séparation UHPLC, une colonne Thermo Hypersil Gold C18 (100 mm x 2,1 mm, taille des particules 1,9 μm , taille des pores 175 Å) thermostatée à 35° C a été utilisée. La colonne UHPLC était équipée d'un préfiltre de colonne de 0,2 μm . Des détails sur le gradient d'éluion chromatographique sont fournis dans le SI (**Tableau S1**), ainsi que des chromatogrammes UHPLC-HRMS représentatifs montrant la séparation des 4 isomères dans de l'eau de lac dopée (**SI Figure S1**). (Dans cette étude deux colonnes avec les mêmes caractéristiques ont été utilisées pour le nombre élevé (n=390) d'échantillons analysés).

La détection de l'analyte a été réalisée à l'aide de l'ionisation négative par électronébulisation (ESI) et d'un spectromètre de masse Thermo Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) avec une gamme de MS à balayage complet de m/z 200-600 et un réglage de résolution de 70 000 largeur à mi-hauteur (FWHM ; valeur à m/z 200). De plus amples détails sur la source ESI et les paramètres d'acquisition MS sont fournis dans le SI (**Tableau S1**).

En outre, les microcystines totales (ΣMC) ont été examinées conjointement avec les BMAA/isomères pour les sites d'échantillonnage à haute intensité (**Figure 16**, sites #4 et #34). Les ΣMC ont été analysées par la mesure de la fraction de l'acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phénylbutyrique (MMPB) générée par oxydation de Lemieux-von Rudloff, adaptée d'une méthode précédente [36]. Une partie de l'échantillon ayant réagi a été dopée avec du SILO (MMPB-d3) et analysée par SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse en tandem UHPLC (TSQ Quantiva, Thermo

Scientific, San Jose, CA, USA). De plus amples détails sur la méthode d'analyse de Σ MC sont résumés dans le SI (**Texte S1 et Tableau S2**).

4.4 Validation de la méthode analytique et contrôle qualité

L'identification de la BMAA et de ses isomères dans les échantillons d'eau de surface était basée sur la correspondance des temps de rétention ($\pm 0,1$ min) avec les étalons de la courbe d'étalonnage (p. ex., figure S1 du SI) et sur la précision de la masse exacte observée par rapport aux m/z théoriques (tolérance de ± 5 ppm).

La méthode analytique a été précédemment soumise à une validation adaptée à la matrice dans l'eau d'un lac [61], y compris l'évaluation de la linéarité ($R^2 = 0,9963-0,9982$), de l'exactitude de la méthode complète (des échantillons dopés de contrôles qualités de 75 ng L^{-1} , exactitude = $76-101 \%$) et de la précision intermédiaire (75 ng L^{-1} , RSD intra journalière de $2,1-6,7 \%$ et RSD inter journalière de $8,1-13 \%$). Un étalonnage adéquat à la matrice a été effectué, et les effets relatifs de la matrice (ajouts dosés à des échantillons d'eau de lacs) étaient compris entre -22% et $+17 \%$ [30].

Après la validation de la pertinence de la capacité de la méthode [61], des mesures continues d'AQ/CQ ont été mises en œuvre pour la présente étude. Des blancs de méthode ont été effectués pour chaque lot d'échantillons en utilisant des aliquotes d'eau de surface provenant du lac Pohénégamook (QC, Canada) « matrix matched » c'est une eau qui ne contient pas les analytes recherchés et soumis à l'ensemble de la procédure de préparation ; aucune contamination particulière n'a été notée. Les limites de détection de la méthode dans la présente étude étaient de 5 ng L^{-1} pour l'AEG et de 10 ng L^{-1} pour le BAMA, la BMAA et le DAB. Une courbe d'étalonnage en 8 points basée sur la matrice ($15-1000 \text{ ng L}^{-1}$, ajouts dosés à une matrice d'eau provenant du lac Pohénégamook, QC, Canada) a été réalisée au début de chaque séquence LC-MS, avec des coefficients de détermination (R^2) dans la plage typique de $0,995-0,999$. Après l'étalonnage initial, des étalons de vérification continue

de l'étalonnage (CCV) ont été utilisés comme contrôles (niveau de fortification : 75 ng L⁻¹). La précision des étalons CCV devait être comprise entre 70 et 120 % [97].

4.5 Traitement des données et analyses statistiques

Le traitement des données LC-MS a été réalisé à l'aide du logiciel Xcalibur 4.3 (Thermo Scientific). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel statistique R, version 4.1.1 (R Core Team [38]). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$. L'analyse en composantes principales (ACP) des variables centrées réduites a été réalisée à l'aide du pack R *FactoMineR* (graphiques tracés avec *factoextra* et *ggplot2*). Les tests des rangs signés de Wilcoxon pour les données appariées ont été utilisés pour évaluer les différences statistiques entre les traitements TCA et non TCA; les différences statistiques ont pu être étudiées pour l'AEG et le DAB uniquement, c'est-à-dire les deux composés présentant des fréquences de détection suffisantes avec les deux méthodes. La carte des emplacements des échantillons a été conçue en utilisant Quantum GIS (QGIS 3.6 Noosa) comme système d'information géographique, et les cartes de base ont été obtenues de *Natural Earth* (données cartographiques disponibles sur naturalearthdata.com).

Chapitre 5. Présence des isomères de la BMAA dans les lacs et réservoirs pollués par des algues au Brésil, au Canada, en France, au Mexique et au Royaume-Uni.

Résumé : l'article ci-dessous présente les résultats des concentrations des isomères de BMAA lors de l'analyse des eaux de surface pollués par des algues bleu-vert dans plusieurs pays (environ 390 échantillons)

Note sur ma contribution :

L'étude bibliographique, la manipulation au laboratoire pour la validation de la méthode, l'interprétation des résultats et la rédaction de l'article.

Mes co-auteurs Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Tuc Dinh Quoc, Dana Simon et Sébastien Sauvé, ont aussi participé à la rédaction et la révision de l'article.

Occurrence of BMAA isomers in bloom-impacted lakes and reservoirs of Brazil, Canada, France, Mexico, and the United Kingdom

Safa Abbes,¹ Sung Vo Duy,¹ Gabriel Munoz,¹ Quoc Tuc Dinh,¹ Dana F. Simon,¹ Nathalie Fortin,² Charles W. Greer,² Megan Larsen,³ Jason J. Venkiteswaran,³ Helen M. Baulch,⁴ Barry Husk,⁵ Fernando Martínez-Jerónimo,⁶ Alessandra Giani,⁷ Brigitte Vinçon-Leite,⁸ Sébastien Sauvé ^{1*}

¹. Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

². Energy, Mining and Environment Research Centre, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada.

³. Department of Geography and Environmental Studies, Wilfrid Laurier University, Waterloo, ON, Canada.

⁴. School of Environment and Sustainability, Global Institute for Water Security, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

⁵. BlueLeaf Inc., Drummondville, QC, Canada.

⁶. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Mexico City, Mexico.

⁷. Department of Botany, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

⁸. LEESU, École des Ponts, Université Paris Est Créteil, Marne-la-Vallée, France.

*Corresponding author. sebastien.sauve@umontreal.ca

Abstract: The neurotoxic alkaloid β -N-methyl-amino-l-alanine (BMAA) and related isomers, including N-(2-aminoethyl glycine) (AEG), β -amino-N-methyl alanine (BAMA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB), have been reported previously in cyanobacterial samples. However, there are conflicting reports regarding their occurrence in surface waters. In this study, we evaluated the impact of amending lake water samples with trichloroacetic acid (0.1M TCA) on the detection of BMAA isomers, compared with pre-existing protocols. A sensitive instrumental method was enlisted for the survey, with limits of detection in the range of 5-10 ng L⁻¹. Higher detection rates and significantly greater levels (paired Wilcoxon's signed-rank tests, $p < 0.001$) of BMAA isomers were observed in TCA-amended samples (method B) compared to samples without TCA (method A). The overall range of B/A ratios was 0.67-8.25 for AEG (up to +725 %) and 0.69-15.5 for DAB (up to +1450 %), with absolute concentration increases in TCA-amended samples up to +15,000 ng L⁻¹ for AEG and +650 ng L⁻¹ for DAB. We also documented the trends in the occurrence of BMAA isomers for a large breadth of field-collected lakes from Brazil, Canada, France, Mexico, and the United Kingdom. Data gathered during this overarching campaign (overall $n = 390$ within 45 lake sampling sites) indicate frequent detections of AEG and DAB isomers, with detection rates of 30 % and 43 % and maximum levels of 19,000 ng L⁻¹ and 1,100 ng L⁻¹, respectively. In contrast, BAMA was found in less than 8 % of the water samples, and BMAA not found in any sample. These results support analyses of free-living cyanobacteria, wherein BMAA was often reported at concentrations 2-4 orders of magnitude lower than AEG and DAB. Seasonal measurements conducted at two bloom-impacted lakes indicated limited correlations of BMAA isomers with total microcystins or chlorophyll-a, which deserves further investigation, the seasonal variation of BMAA isomers concentrations is important in June and July mainly due to different factors such as temperature changes and drought.

Keywords: Lake water; β -N-methyl-amino-l-alanine (BMAA); 2,4-diaminobutyric acid (DAB); N-(2-aminoethyl) glycine (AEG); trichloroacetic acid (TCA); temporal trends.

5.1 Introduction

Cyanobacteria produce a host of secondary metabolites, some of which can present toxic effects in plants, invertebrates, and vertebrates during acute or chronic exposures [106]. The neurotoxin β -N-methyl-amino-L-alanine (BMAA) is a nonproteinogenic amino acid suspected to be implicated in the etiology of neurodegenerative diseases [4,5,14,15,99]. It was originally discovered in the Pacific Island of Guam, where it was produced by the cyanobacterium *Nostoc* sp. in endosymbiosis within the coralloid roots of cycads [102]. BMAA exposure—through the consumption of cycad seed flour and flying fox bats that bioconcentrated the toxin—was suggested as one of the possible factors for the high incidence rates of amyotrophic lateral sclerosis and endemic neuronal diseases observed there [102]. BMAA and some of its structural isomers, including N-(2-aminoethyl) glycine (AEG), β -amino-N-methylalanine (BAMA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB), may also be produced in aquatic ecosystems during cyanobacterial harmful algal blooms (CyanoHABs). Phytoplanktonic phyla other than cyanobacteria, including ochrophyta (photosynthetic heterokonts, e.g., diatoms) and myzozoa (e.g., dinoflagellates), may also be capable of biosynthesis [50]. Hence, accidental ingestion of contaminated surface water during recreational activities, and consumption of contaminated drinking water, fish, shellfish [103] and spirulina food supplements [2], are other potential human exposure routes.

BMAA typically occurs at low-moderate levels in free-living cyanobacteria (ng g⁻¹ to μ g g⁻¹ dry weight) [50,53,54,55] and presumably at much lower levels in bulk surface waters (extracellular dissolved, ng L⁻¹ to μ g L⁻¹) [9,56,57,58]. This implies that BMAA and its isomers may escape detection in environmental waters. In addition, few studies have targeted environmental waters for BMAA monitoring, compared with biological samples [50].

Trace analysis of BMAA can be complex to implement, as described in several reviews [7,8,54]. Re-evaluation of pre-existing analytical methods has also demonstrated the potential for QA/QC failures [36,57]. Difficult chromatographic retention of underivatized BMAA and its resolution from co-occurring isomers (e.g., AEG, BAMA, and DAB) are well-known issues, but there exist other pitfalls. For instance, Roy-Lachapelle et al. [56] showed that dissolved AEG, BMAA, and DAB could suffer significant losses (>60 %) with certain types of filtration materials, including glass fiber filters (GFF). As a basic amino acid, BMAA could also adhere to the surface of other glassware materials [7], potentially resulting in underreporting of concentrations. There are also cases where overreporting may be observed. Faassen et al. [57] evaluated a commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and showed that the kit was not suitable for BMAA screening in surface waters. Recoveries were as high as 400 % in spiked samples and the ELISA kit yielded positive BMAA results in nearly all field samples (max of 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ for pond water), contrasting with no detections in the corresponding split samples submitted to LC-MS/MS [57]. A similar issue was recently noted by Zhang et al. [59] during the analysis of BMAA in surface runoff waters by the two instrumental techniques. The false positive results sometimes obtained with ELISA in natural waters [57,59] and other complex matrixes [60] are likely due to interferences with co-occurring matrix components. A critical review of the BMAA literature also noted serious flaws in the validation and reporting of analytical procedures [54]. Use of unsuited or insufficiently documented analytical methods may partly explain the BMAA controversy—i.e., the current lack of consensus over widespread presence of BMAA in aquatic ecosystems [7,54].

Another critical aspect relates to the fact that BMAA can exist in different forms. For instance, for solid samples, free, soluble bound, and precipitated bound BMAA fractions have been investigated [1]. Faassen et al. confirmed that solid biological samples (cycad seeds, seafood, and exposed cladocerans) pre-treated with

trichloroacetic acid (TCA) and hydrochloric acid (HCl) had BMAA concentrations greatly surpassing the free BMAA fraction [1]. Lage et al. found higher recoveries of BMAA from *Spirulina* powder (*Anthrospira fusiformis*) with an aqueous solution of 0.1M TCA, compared with solvent mixtures without TCA (e.g., methanol/water or methanol/acetone) [11]. In the previous workflows targeting BMAA in surface water, the samples typically were not amended with strong acids [53,56,61,104]. Although SPE (on-line or off-line) was used as a pre-concentration step, BMAA was rarely detected in lake water [61]. BMAA isomers might be bound with metals, organic colloids, or cell residues in water, and this may lead to underestimation using the currently available procedures for surface water samples. Whether amending the lake samples with strong acid would yield different results has not been previously explored.

The large number of lakes targeted for cyanotoxin analysis within the framework of the ATRAPP project (*Algal Blooms, Treatment, Risk Assessment, Prediction and Prevention*) provided an opportunity to address the knowledge gap. We also aimed to confirm whether BMAA and its isomers would be widely occurring in freshwater lakes impacted by harmful cyanobacterial blooms. In the first step, field-collected surface water samples were processed by two different methods to evaluate the influence of 0.1M TCA amendment (method A: without TCA; method B: with TCA). A sensitive instrumental method relying on on-line enrichment of derivatized BMAA/isomers and liquid chromatography high-resolution mass spectrometry was applied [61]. In the second step, we used method B (with TCA) to examine the presence of AEG, BAMA, BMAA, and DAB in a larger number of environmental water samples. The monitoring included 390 samples from 45 lakes and reservoirs of Brazil, Canada, France, Mexico, and the United Kingdom (**Figure 1**). To the best of our knowledge, this is the first study to report on the occurrence of BMAA isomers in lake samples at such a large spatial scale.

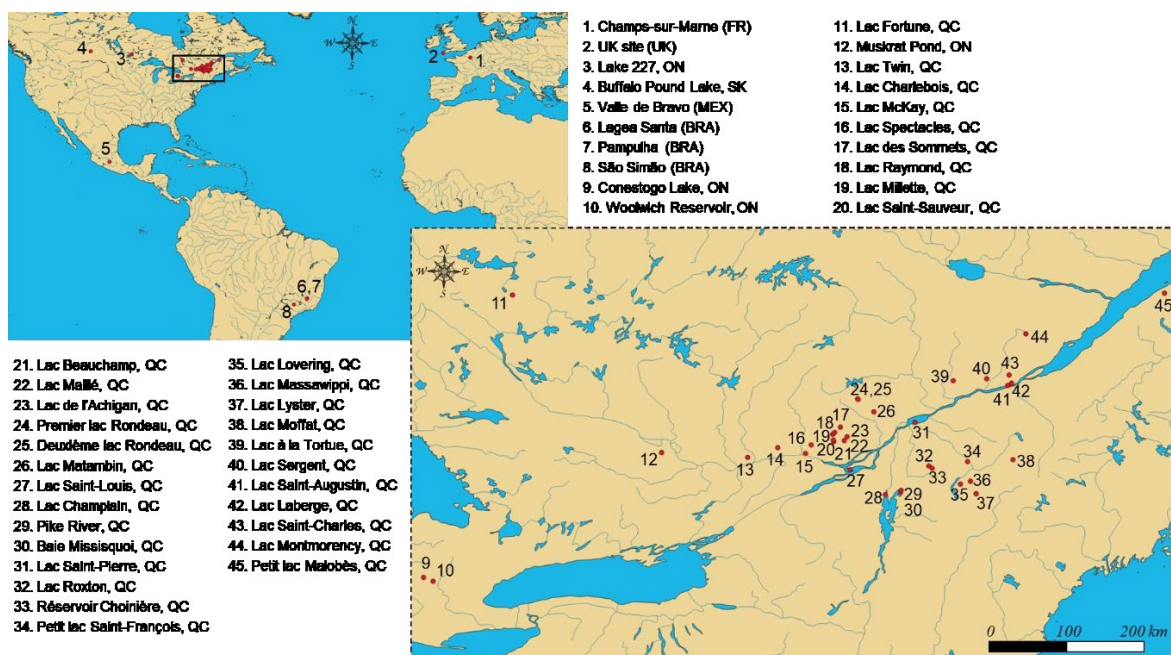


Figure 1. Geographical location of the 45 sampling sites monitored in the present survey, including lakes and reservoirs of Brazil (BRA), Canada (Ontario (ON), Québec (QC), and Saskatchewan (SK)), France (FR), Mexico (MEX), and the United Kingdom (UK). Sampling was conducted at different locations within some lakes to account for local variations of CyanoHABs (e.g., sites #4, #5, #9, #28, #30, #34), different water column depths (e.g., site #4), or different days during seasonal high-intensity sampling (e.g., sites #4 and #34), leading to an overall number of $n = 390$ environmental water samples for analysis.

5.2 Results and discussion

5.2.1 Influence of TCA addition

Surface water samples were analyzed using two sample preparation methods: A – without TCA amendment [56,61]; and B – with 0.1M TCA [1,10,105].

Of 158 surface water samples analyzed with both methods (SI Table S3), 69 samples (43 %) were positive for at least one of the four isomers with method A, while higher detection rates were obtained with the addition of 0.1M TCA (119/158 positive samples or 75 %). Compound-dependent detection rates were also lower using method A (AEG 19 %, BAMA 3 %, DAB 35 %) than method B (AEG 42 %, BAMA 15 %, DAB 62 %). Interestingly, BMAA itself was not detected in any of the surface

water samples using either method (SI **Table S3**), contrasting with relatively widespread occurrence of its isomers AEG and DAB. In a previous study [1], we had detected BMAA in only one sample (out of 82) using the same analytical approach as method A.

The concentrations of BMAA isomers were significantly greater using method B *vs.* method A (paired Wilcoxon's signed-rank tests, p-values: p_{AEG} and $p_{\text{DAB}} < 0.001$). When a concentration value could be simultaneously returned by both methods (matching pairs calculation method), concentration ratios (B/A) greater than unity were frequently observed. Samples with concentrations greater than 100 ng L⁻¹ (by either method) almost systematically followed the $B > A$ trend (**Figure 2**), with median ratios of 3.9 (i.e., +290 % with TCA amendment) and 1.5 (+50 %) for AEG and DAB, respectively. At the site location with the highest AEG concentration (Petit lac Saint-François), amending the sample with TCA led to an increase of *ca.* 5.3 times (+430 %) of the determined concentration (19000 *vs.* 3600 ng L⁻¹), variation in the concentration of BMAA isomers depend on the toxicity of blooming cyanobacteria.

Median ratios higher than unity were also observed for the full scope of samples without concentration thresholds (i.e., median B/A of 2.4 and 1.3 for AEG and DAB, respectively). The overall range of B/A ratios was 0.67-8.25 for AEG (i.e., up to +725%) and 0.69-15.5 for DAB (i.e., up to +1450%). While a slightly negative influence (down to -33%) can be considered to fall within the analytical variation, the large increase observed at several locations cannot. In addition, use of internal standardization (BMAA-d3 spiked before derivatization) and matrix-matched calibration for each protocol likely corrected for possible instrumental variations [61].

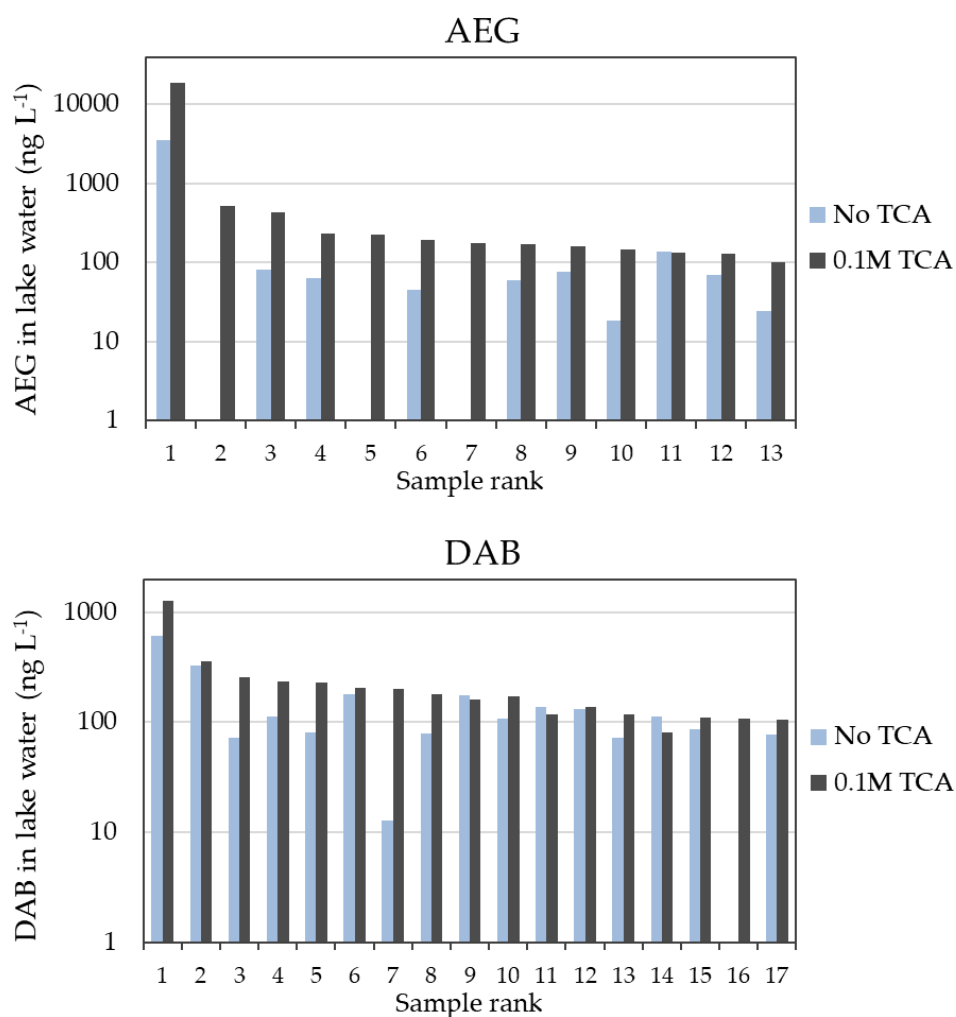


Figure 2. Quantified concentrations (ng L^{-1}) of AEG and DAB in surface water samples with or without 0.1M TCA, for those samples with concentrations greater than 100 ng L^{-1} (in the figure x-axis, samples are ranked according to decreasing AEG and DAB concentrations by either method). Due to the ranges of concentrations in environmental samples from different locations, a logarithmic scale was applied to the y-axis. AEG data below the detection limit of 5 ng L^{-1} for three samples (rank: 2, 5, and 7) without TCA added; DAB data below the detection limit of 10 ng L^{-1} for one sample (rank: 16) without TCA added.

Based on the above, we can conclude that TCA addition had a significant influence on detection rates and concentrations of BMAA isomers in lake water. To the best of our knowledge, this is the first study to report on this type of impact for water samples. Complexation of amino acids with metallic or organic ligands may be reduced under the low pH conditions of method B ($\text{pH} < 1$) [106] compared with

method A (circumneutral pH). Low pH conditions could also favor the precipitation or denaturation of medium- and long-chain peptides [107] (e.g., originated from cellular debris) that could otherwise engage in hydrogen bond interactions. This could explain the different detection trends of BMAA isomers between the two methods. The magnitude of the increase with the TCA method was also slightly higher for samples with greater concentrations of BMAA isomers, which could reflect enhanced sequestration potential in the more complex water bloom samples unless treated with method B. Addition of TCA may be recommended for future studies targeting dissolved BMAA in ambient water, while stronger conditions (e.g., involving additional hydrolysis with 6M HCl) would be required for biotic tissues and lyophilized cyanobacterial samples [1].

5.2.2 Occurrence trends of BMAA isomers in 390 lake samples

An overall 390 surface water samples from 45 different locations (**Figure 1**) were analyzed for BMAA isomers, using the 0.1M TCA method. The associated descriptive statistics, including detection rates and concentration ranges, are summarized in **Table 1**. Detailed concentrations per sample and aggregated literature data from an additional 136 samples (**Table 2**) are also provided in the Supporting Excel data.

Of 390 samples, 222 (57%) were positive to at least one of the BMAA isomers. AEG and DAB were the most recurrently detected isomers (30% and 43% of samples with hits), while BAMA was found in only 7.4% of samples and BMAA was not found above the method detection limit (LOD of 10 ng L⁻¹) in any sample. AEG and DAB co-occurred in 16% of the samples, while 6% of the samples had detectable levels for the three isomers simultaneously (AEG, BAMA, and DAB). The number of lakes with positive detections was 21/45 for AEG and 15/45 for DAB. BAMA was found at 5 locations only (Buffalo Pound Lake, Conestogo Lake, Lac Saint-Augustin, Petit lac Saint-François and Woolwich Reservoir).

Ten locations presented maximum concentrations of AEG and/or DAB above 100 ng L⁻¹: Buffalo Pound Lake, Conestogo Lake, Lac Beauchamp, Lac Fortune, Lac Millette, Lac Saint-Augustin, Lac Saint-Pierre, Missisquoi Bay, Petit lac Saint-François, and the UK site. Maximum observed concentrations for each isomer were 19,000 ng L⁻¹ for AEG (Petit lac Saint-François), 1,100 ng L⁻¹ for DAB (Petit lac Saint-François), and 56 ng L⁻¹ for BAMA (Buffalo Pound Lake) (**Table 1**). Maximum concentrations of BMAA isomers in the µg L⁻¹ range agree with previous surveys of Cyano-HAB impacted lakes and reservoirs in Canada [58,61] and the United States [9] (**Table 2**). Detailed concentrations per sample and aggregated literature data from an additional 136 samples (**Table 2**) are also provided in the Supporting Excel data.

Table 1. Descriptive statistics, including detection frequency (% of samples >LOD) and concentration ranges (min-max and average, ng L⁻¹) of BMAA isomers in surface water samples (n = 390, TCA method), the concentration of the non-detected samples was counted as zero. Site locations with concentrations punctually surpassing 100 ng L⁻¹ are also indicated (maximum observed concentration parenthetically noted). PLSF: Petit lac Saint-Francois; BPL: Buffalo Pound Lake.

	AEG	BAMA	BMAA	DAB
LOD (ng L ⁻¹)	5	10	10	10
Detection rate %	30	7.4	0	43
Min (ng L ⁻¹)	5	15	-	10
Max (ng L ⁻¹)	19000	56	-	1100
Average* (ng L ⁻¹)	220	NC***	NC***	58
Average** (ng L ⁻¹)	67	NC***	NC***	25
Sites >100 ng L ⁻¹ (max, ng L ⁻¹)	PLSF (19000) BPL (518) Conestogo (225) Lac Millette (178) UK site (125)	-	-	PLSF (1100) Lac Saint-Augustin (359) Lac Fortune (316) Lac Millette (230) Lac Saint-Pierre (224) Lac Beauchamp (136) BPL (119) Missisquoi Bay (109)

*Average of samples with positive detections only. **Average of all samples (n = 390) including non-detect data. ***NC: Not calculated. The average was not calculated for compounds of low detection frequencies.

Relatively high concentrations of AEG and DAB in some samples and concomitant lack of BMAA detection agrees with a previous survey of lakes and rivers from Eastern Canada [61]. The results can also be related to a monitoring survey of cyanobacterial blooms in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada [54]. In that study, the levels of AEG and DAB found in cyanobacterial samples (averages of 2120 and 170 $\mu\text{g g}^{-1}$) were 2-3 orders of magnitude higher than those of BMAA (average of 4.05 $\mu\text{g g}^{-1}$) [54]. A similar trend was observed in marine mats of the Arabian Gulf (Khor Al Adaid) and Australian cyanobacterial blooms, with AEG and/or DAB often 3-4 orders of magnitude higher than BMAA [53,54]. If BMAA was present in surface water from our survey, concentrations 2-4 orders of magnitude lower than AEG or DAB would fall below the detection threshold (10 ng L^{-1}). While a few studies did report detectable levels of BMAA in lake water samples [9,56] (see also **Table 2**), the present study and other surveys [53,54,61] suggest that AEG and DAB isomers may be more prevalent than BMAA. However, monitoring of a much higher number of aquatic ecosystems would be needed for confirmation.

Table 2. Overview of literature data reporting BMAA and its isomers in water samples of freshwater (lakes, rivers, and reservoirs) and saltwater (seawater) environments, including instrumental methods, limits of detection (LOD, ng L^{-1}), type and number of field-collected samples, and concentration ranges (min-max of positive samples, ng L^{-1}). Sample-specific concentration data of the present study and aggregated literature are also provided in the Supporting Excel data.

	Abbes et al. (This study)	Al Samaak et al.	Chatziefthimiou et al.	Roy-Lachapelle et al.	Vo Duy et al.
Instrumental method	LC-HRMS	LC-FLD	LC-MS	LC-HRMS	LC-HRMS
LOD range ng L ⁻¹	5-10	5000-7000	N/A	7-9	2-5
Water matrix	Lakes	Lakes	Seawater	Lakes	Lakes & rivers
Site location(s)	5 countries*	USA	Qatar	Canada	Canada
Year of collections	2016-2021	2009-2010	2012-2013	2009, 2013	2016-2018
Number of samples	n = 390	n = 24	n = 18	n = 12	n = 82
AEG (min-max) ng L ⁻¹	5-19000	Not analyzed	35/38 **	9-80	2-4900
BAMA (min-max) ng L ⁻¹	15-56	Not analyzed	Not analyzed	Not analyzed	41-130
BMAA (min-max) ng L ⁻¹	Not detected	1800-25300	6.5/7 **	10-300	110 ***
DAB (min-max) ng L ⁻¹	10-1100	1780-21100	430/610 **	8-40	13-1900

*Brazil, Canada, France, Mexico, and the United Kingdom. **Mean of positive samples from the 2012/2013 surveys. ***Only one sample above the LOD.

5.2.3 Monitoring of two CyanoHAB impacted lakes during the bloom season

Monitoring conducted at two sites allowed to examine time trends of BMAA isomers during the bloom season (Buffalo Pound Lake; BPL) or throughout the entire year (Petit lac Saint-François; PLSF—also referred to as Lake Tomcod in the literature). Selection of sampling sites for this study was aligned with previous reports of relatively high AEG/DAB levels at these two locations, compared with a range of other Canadian lakes from New Brunswick, Nova Scotia, Ontario, Québec, and Saskatchewan [53,56,61]. Both BPL and PLSF have also been experiencing significant cyanobacterial bloom-related stressors [108,109].

BPL is a shallow polymictic lake of elongated shape (~29 km x 1 km, max. depth of 5.8 m) located in the Canadian prairies. It also serves as a major drinking water supply for the cities of Moose Jaw and Regina [110], representing 25% of Saskatchewan's population. Occurrences of harmful cyanobacterial algal blooms in BPL and related poisoning of dogs, cattle and poultry were reported as early as the 1960s [110]. The BPL campaign includes 49 water samples collected between May 29 and October 3, 2019, examined for BMAA isomers and other parameters (**Figure 3**).

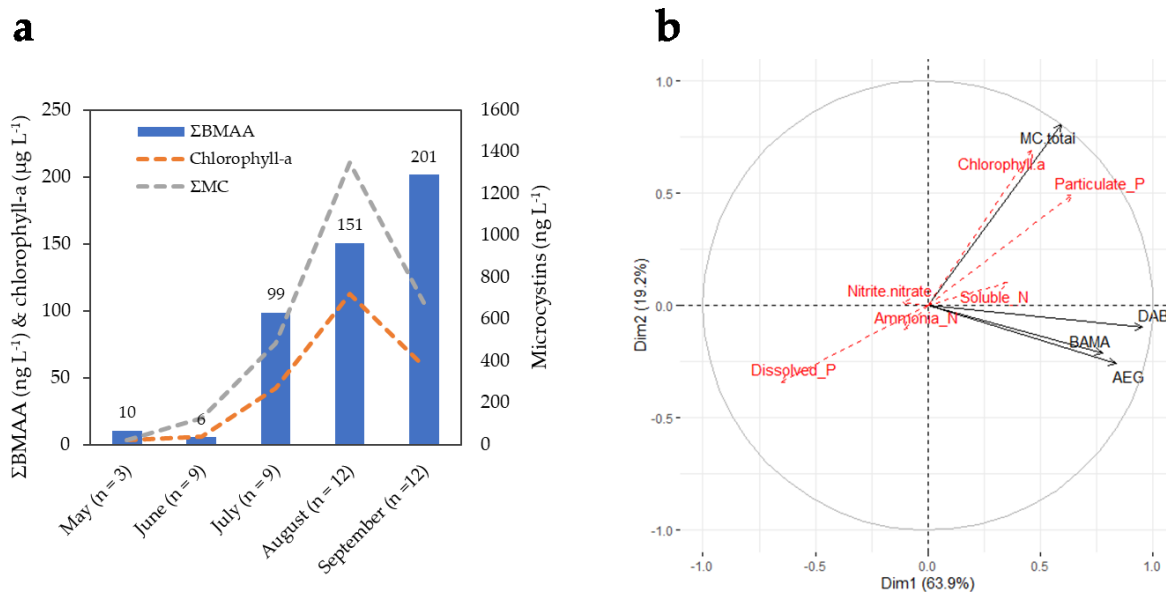


Figure 3. Monthly averages of summed BMAA isomers (ng L^{-1}), chlorophyll-a ($\mu\text{g L}^{-1}$), and total microcystins (ng L^{-1}) (MMPB method) in Buffalo Pound Lake during the 2019 sampling season. Summed BMAA isomers and chlorophyll-a are plotted against the primary (left) y-axis, while the secondary (right) y-axis is used for total microcystins. (The different y-axis scales are for visualization purposes only, and do not refer to scaled toxicities). (3b) Principal component analysis (PCA) correlation circle of active variables (total MCs, AEG, BAMA, DAB) and additional environmental variables superimposed on the plot (red font dotted arrows). To deal with different units/scales between environmental variables, data were transformed (center-reduced) prior performing the PCA. Temperature data were not available for all dates and therefore, could not be included in the PCA.

Monthly concentrations of summed BMAA isomers (ΣBMAA -isomers: AEG+BAMA+DAB) in BPL water samples are plotted in **Figure 3a**. Average concentrations of BMAA isomers remained at or below detection limits in the late spring months ($\sim 6\text{-}10 \text{ ng L}^{-1}$), increased by about 10-20 times in July-August ($\sim 100\text{-}150 \text{ ng L}^{-1}$) concomitantly with total microcystins (ΣMC), and were still increasing in September ($\sim 200 \text{ ng L}^{-1}$) while the levels of ΣMC had already receded. In **Figure 3b**, vectors of AEG, BAMA, and DAB are on the same PCA correlation quadrant

(i.e., highly correlated together) but near-orthogonal (i.e., unrelated) to those of Σ MC and chlorophyll-a. Pip et al. also observed nonsignificant or weakly significant correlations of BMAA and microcystins in water samples of Lake Winnipeg, Canada [58]. BMAA and isomers may be produced by later-blooming communities compared with those responsible for the observed peak of Σ MC. Related BPL taxonomic identification suggested a shift in community composition from *Dolichospermum flos aquae* to *Planktothrix agardhii* dominated blooms during the 2019 season, which might be associated with different toxigenic cyanopeptides profiles, as recently discussed in Painter et al. (2022).

PLSF is a shallow hypereutrophic lake (1.7 km x 0.7 km, max. depth of 2m) located in the municipality of Saint-François-Xavier-de-Brompton (Estrie, QC, Canada). Nutrient physicochemistry indicates a relatively poor water quality status and advanced eutrophication [55,110]. A subset of 66 PLSF water samples collected between January 22 and December 17, 2019, were included for analysis (**Figure 4**). A high sampling intensity was achieved during the 2-month summer bloom period with near-daily sample collections. Concentrations of AEG and DAB were low in the winter and spring seasons (<5-50 ng L⁻¹), at or near background levels of Québec rivers without known CyanoHAB impacts ([61]; see also Supporting Excel data). AEG concentrations drastically increased at ca. 1200 ng L⁻¹ in mid-August and then peaked to even higher levels (19,000 ng L⁻¹) one week later seemingly unrelated to Σ MC (**Figure 4**). Even after removing these two outlier points, the vector of AEG remained orthogonal to that of Σ MC (and DAB) on the PCA correlation circle (SI **Figure S2**). The early summer bloom was dominated by *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum spp.* and *Microcystis aeruginosa* (June-July 2019); similar to BPL, the contribution of *Planktothrix agardhii* increased during the later part of the summer for PLSF. However, biomass is not *per se* indicative of toxin production (microcystin biomass and microcystins do in general show correlation, but this does not always occur with other toxins or other cyanobacteria species). Although clearly beyond the

scope of the present study, multi-year seasonal monitoring and acquisition of metagenome sequencing data may help clarify these trends.

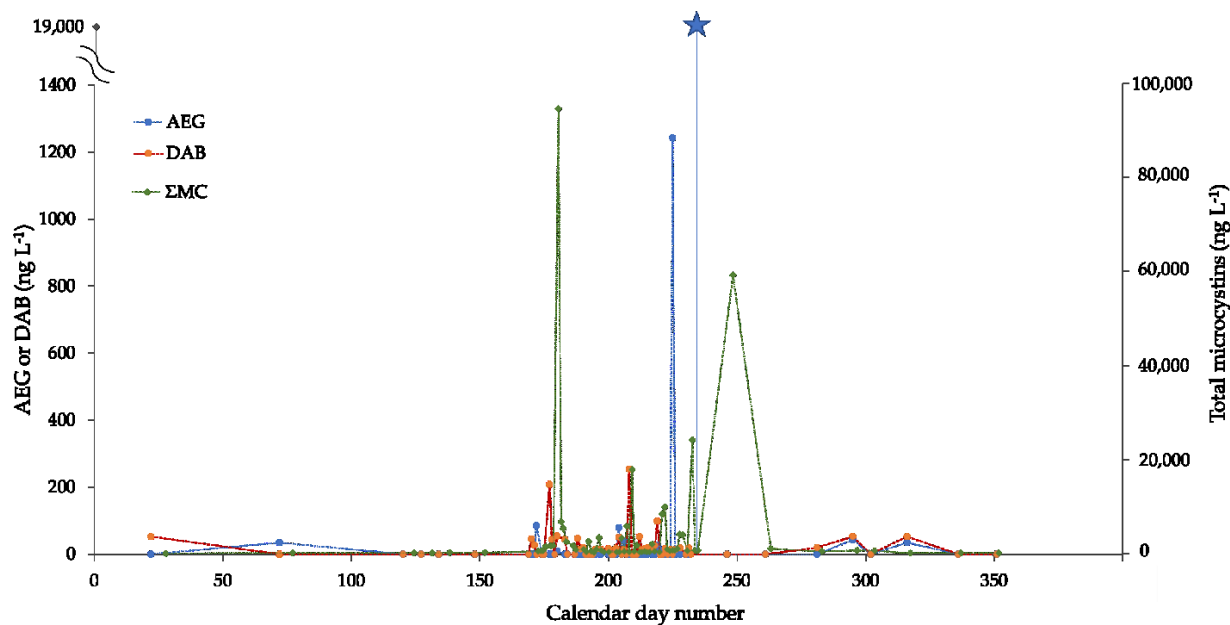


Figure 4. Concentrations of AEG (ng L^{-1}), DAB (ng L^{-1}), and total microcystins (ng L^{-1}) (MMPB method) in lake water samples of Petit lac Saint-François, collected between January and December 2019 (x-axis: calendar day number). A high-frequency intensity sampling was conducted during the 2-month summer bloom period (June–August) with near-daily sample collections. AEG and DAB concentrations are shown in the primary (left) y-axis, while total microcystins are plotted against the secondary (right) y-axis. (The different y-axis scales are for visualization purposes only, and do not refer to scaled toxicities). The primary axis break is applied to plot an extremely high value of AEG observed on August 20, 2019 (19000 ng L^{-1} , blue star marker).

5.3 Conclusion

In this study, we evaluated trends of BMAA isomers in lake water with two protocols variations. We observed that previously published procedures that did not involve TCA addition may lead to lower levels of extracellular concentrations of BMAA isomers, compared with TCA-amended samples. The magnitude of the difference was variable depending on the water source but could reach values as

high as 15 times for the TCA method (and a maximum observed magnitude difference of +15,000 ng/L for AEG). The standard TCA concentration used in our study was derived from the literature on BMAA analysis of solids, such as cycad seeds, shellfish, and powdered cyanobacteria [10,11]. The herein described procedure may still require additional refinement, including optimization of the TCA concentration [11] or investigation of hydrolysis under stronger conditions, such as concentrated HCl/heat [10]. Since our current method involves derivatization and large volume injection (1 mL) on-line SPE – UHPLC-HRMS, it was not deemed feasible to include a 6M HCl hydrolysis step of the bulk lake water. To avoid substantial sample dilution, testing of a harsher hydrolysis step would likely necessitate pre-emptive freeze-drying of the lake water aliquots prior to reconstitution in a small volume of concentrated HCl.

The TCA method was applied to a large set of field-collected lake samples from America and Europe (overall n = 390). BMAA was not found (LOD of 10 ng L⁻¹) in any of the 45 lakes monitored during the bloom season, while two of its isomers, AEG and DAB, could reach peak concentrations in the µg L⁻¹ range. The results from the present study and a few others [3,53,54,61,114] indicate that BMAA may be less common in freshwater cyanobacterial algal blooms than previously thought. The most frequent occurrences of AEG and DAB were reported here for lakes with known cyanobacterial bloom impacts and sampled during the summer-fall bloom season. Much lower detection rates were observed here in the winter-spring season for the two lakes submitted to temporal monitoring. BMAA isomers are also expected to fall in the low or nondetectable ranges for other types of water bodies, including rivers [29].

While DAB may show similar neurotoxic effects as BMAA [115], *in vitro* bioassays suggest that AEG may be less toxic than BMAA and DAB [116,117]. Though no guidelines are currently available for BMAA in water, we note that peak levels of total microcystins far exceeded the interim drinking water advisory levels in one of

the lakes targeted for seasonal monitoring. With some modifications of the sample preparation or instrumental procedures, the sensitive method could be expanded to the study of BMAA isomers in fish, shellfish, and spirulina food supplements, in future work. Future surveillance and cyanotoxin risk assessment studies in bloom-impacted freshwater and marine ecosystems should preferably include analysis of BMAA isomers along with other cyanotoxins, and taxonomic analysis of the phytoplankton.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Chemicals and standards

N-(2-aminoethyl) glycine (AEG) was obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). β -N-methylamino-L-alanine hydrochloride (L-BMAA) (purity \geq 97.0%) and L-2,2-diaminobutyric acid dihydrochloride (DAB) (purity \geq 95.0%) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). β -amino-N-methyl-alanine (BAMA) was acquired from the National Research Council of Canada (Halifax, NS, Canada). The isotope-labelled internal standard L-BMAA hydrochloride-d₃ (BMAA-d₃) was purchased from Abraxis, Inc. (Warminster, PA, USA).

Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and water of HPLC quality were purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Ammonium acetate (purity \geq 98%), sodium citrate dibasic sesquihydrate (citrate; purity 99.0%), sodium tetraborate decahydrate (borate; purity 99.5%), potassium hydroxide (KOH; purity 90%), and trichloroacetic acid (TCA; purity \geq 99.0 %) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). The derivatizing agent 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl; 98.0% purity) was obtained from Alfa Aesar (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada).

5.4.2 Sample collections

Surface water samples (n=390) were collected in 2016-2021 from 45 locations in Brazil, Canada (from the provinces of Ontario, Québec, and Saskatchewan), France, Mexico, and the United Kingdom. Their geographical distribution is illustrated in **Figure 1**. Several of these sites correspond to freshwater lakes with a documented history of harmful cyanobacterial blooms [15,41,100,111]. Sampling was conducted as part of the ATRAPP project by trained university staff and partners. Additional water samples from bloom-impacted lakes were obtained through a citizen-science project (*Adopt a Lake*) [102]. Surface water samples for cyanotoxin analysis were collected in 125-mL amber polyethylene terephthalate glycol-modified (PETG) bottles previously washed in the laboratory and rinsed *in situ* three times with the site surface water. Samples were kept at 4°C and shipped within 1-3 days of collection to the analytical facilities where they were lysed (three freeze-thaw cycles) prior to storage at -20 °C [103] until preparation and analysis.

In addition, 500-mL wide-mouth high-density polyethylene (HDPE) bottles (opaque, acid-washed) were co-collected for the analysis of ancillary surface water parameters, such as nutrients and chlorophyll-a, filtered and stored at 4°C until analysis. Nutrient chemistry analyses were performed at the University of Saskatchewan Global Institute for Water Security (Saskatoon, Canada), Environmental Geochemistry Laboratory University of Waterloo (Waterloo, Canada) and Université de Montréal Department of Biological Sciences (Montreal, Canada) using standard methods. Taxonomic analyses were conducted at Water's Edge Scientific LLC (Baraboo, WI, USA). Preserved samples were analyzed according to APHA Method 10200F (APHA, 2012) and cell counting was performed in a Sedgewick-Rafter counting chamber.

5.4.3 Sample preparation

Analysis of surface water samples by method B (with TCA) was performed as follows. An aliquot of the lysed surface water was filtered through a nitrocellulose filter (0.2 μm , 25 mm) fitted onto a syringe filter holder. A 5-mL aliquot of the filtrate was then spiked with the isotopically-labelled internal standard (ILIS: BMAA-d3) to achieve an initial concentration of 500 ng L⁻¹. TCA was added to achieve a concentration of 0.1M [1,10], followed by a 10-min wait time. The solution was brought to circumneutral pH with KOH prior to addition of buffer solutions of borate (0.3 mL of a 100mM solution) and citrate (0.3 mL of a 150mM solution) to achieve a pH of ~9. The mixture was vortexed for 10 seconds (3200 rpm) followed by a 5-min wait time. FMOC-Cl was added to the samples (300 μL of a 3 mg mL⁻¹ solution prepared in ACN) and the derivatization reaction proceeded for 1 h while stirring (200 rpm, lab oven shaker; 65 °C; without light). The samples were left to cool to room temperature and organic cosolvent (300 μL of MeOH) was subsequently added to quench the reaction and minimize sorption losses of FMOC-derived amino acids [61]. Finally, reacted samples were vortexed (10s; 3200 rpm) and centrifuged (10 min; 6000 rpm) prior to aliquoting of 1.5 mL of supernatant in a 2-mL LC-MS vial.

A subset of the surface water samples was also analyzed by method A (without TCA added) [61]. Lysed water samples were filtered (nitrocellulose, 0.2 μm , 25 mm), spiked with BMAA-D3 (500 ng L⁻¹), amended with borate and citrate buffers, and derivatized with FMOC-Cl as previously described.

5.4.4 Instrumental analysis

Derivatized samples were analyzed by on-line solid-phase extraction (on-line SPE) coupled with ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS), adapted from Vo Duy et al. [61] with some modifications.

Injection was performed using a PAL RTC autosampler (Zwingen, Switzerland) and a 1-mL stainless-steel loop (SST). The injection volume was set at 1 mL. On-line enrichment was performed with a Thermo Dionex UltiMate™ 3400 SD pump and a Thermo HyperSep Retain PEP column (hydrophilic lipophilic balance, 20 mm x 2.1 mm, particle size 40-60 µm). Loading flow rate was set at 1,500 µL min⁻¹. After sample loading, the on-line aqueous mobile phase (HPLC water) was allowed to flow for an additional 2 mL to remove salts.

Target analytes were then eluted at 450 µL min⁻¹ in back-flush mode with the analytical mobile phase (A: 2.5 mM CH₃COONH₄ in HPLC water; B: ACN), using a Thermo Dionex UltiMate™ 3400 RS pump. For UHPLC separation, a Thermo Hypersil Gold C18 column (100 mm x 2.1 mm, particle size 1.9 µm, pore size 175 Å) thermostated at 35°C was used. The UHPLC column was fitted with a 0.2-µm column prefilter. Details on the chromatographic elution gradient are provided in SI (**Table S1**), as are representative UHPLC-HRMS chromatograms showing the separation of the 4 isomers in spiked lake water (SI **Figure S1**).

Analyte detection was performed using negative electrospray ionization (ESI) and a Thermo Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) with a full scan MS range of *m/z* 200-600 and a resolution setting of 70,000 full width at half maximum (FWHM; value at *m/z* 200). Further details on the ESI source and MS acquisition parameters are provided in SI (**Table S1**).

Total microcystins (ΣMC) were examined in conjunction with BMAA/isomers for the high-intensity sampling sites (**Figure 1**, sites #4 and #34). ΣMC were analyzed in the nitrocellulose-filtered fraction of the lysed water sample. The 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) moiety generated via Lemieux-von Rudloff oxidation was analyzed using a previously validated method [129]. An aliquot of the reacted sample was spiked with ILIS (MMPB-d₃) and analyzed by on-line SPE coupled to UHPLC tandem mass spectrometry (TSQ Quantiva LC-MS/MS, Thermo

Scientific, San Jose, CA, USA). Further details on the analytical method for Σ MC are summarized in SI (Text S1 and Table S2).

5.4.5 Quality assurance/quality control (QA/QC)

Identification of BMAA and its isomers in surface water samples was based on matching retention times (± 0.1 min) with calibration curve standards (e.g., SI Figure S1) and mass accuracy of observed *vs.* theoretical exact m/z (tolerance of ± 5 ppm).

The analytical method without TCA (method A) was previously subject to matrix-matched validation in lake water [61], including assessment of linearity ($R^2 = 0.9963-0.9982$), whole-method accuracy (spike level of 75 ng L^{-1} , accuracy = 76-101%) and intermediate precision (75 ng L^{-1} , intraday RSD of 2.1-6.7% and interday RSD of 8.1-13%). Matrix-matched calibration was adopted, and relative matrix effects (standard additions to select lake water samples) were within -22% to +17% [61].

Following the initial demonstration of method capability [61], continued QA/QC measures were implemented for the present survey, for both methods A and B. Method blanks were performed for each batch of samples using surface water aliquots from Lac Pohénégamook (QC, Canada) and submitted to the entire preparation procedure; no contamination was noted. Method detection limits in the present study were 5 ng L^{-1} for AEG and 10 ng L^{-1} for BAMA, BMAA, and DAB. An 8-point based matrix-matched calibration curve ($15-1000 \text{ ng L}^{-1}$, additions to a blank lake matrix from Lac Pohénégamook, QC, Canada, subsequently submitted to either method A or B) was performed at the beginning of each LC-MS sequence. Determination coefficients (R^2) were within the typical range of 0.995-0.999. After the initial calibration, continued calibration verification (CCV) standards were run as matrix spikes (fortification level: 75 ng L^{-1}). The accuracy of CCV standards was required to fall within 70-120% [105].

5.4.6 Data curation and statistical analyses

Processing of LC-MS data was performed using the Xcalibur 4.3 software (Thermo Scientific). Statistical analyses were conducted with the R statistical software version 4.1.1 (R Core Team [113]). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Principal Component Analysis (PCA) of center-reduced data was performed using the *FactoMineR* R-package (graphs plotted with *factoextra* and *ggplot2*). Wilcoxon's signed rank tests for paired data were used to evaluate statistical differences between TCA and non-TCA treatments; statistical differences could be investigated for AEG and DAB only, i.e., the two compounds with sufficient detections with both treatments. The map of sample locations was designed using Quantum GIS (*QGIS 3.6 Noosa*) as a geographic information system, and the base maps were obtained from Natural Earth (free vector and raster map data available at naturalearthdata.com).

Acknowledgements

This study was conducted within the framework of the ATRAPP project (*Algal Blooms, Treatment, Risk Assessment, Prediction and Prevention through Genomics*), with financial support from Genome Canada and Génome Québec (LSARP 2016). We also acknowledge funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC-CRSNG; STPGP 478774), the Quebec Research Fund (FRQ; PR-183278), the Canada Foundation for Innovation (CFI; 30044), the Global Water Futures project FORMBLOOM (Canada First Research Excellence Fund), Furnas Centrais Eletricas SA (FURNAS), Companhia Eletrica de Minas Gerais (CEMIG), and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). We thank Katy Nugent, Cameron Hoggarth and others (University of Saskatchewan), Richard Elgood (University of Waterloo), Roxane Poirier (Groupe Hémisphères) as well as the participants of the *Adopt a Lake* campaign for their help in obtaining lake samples from Canada. We acknowledge technical support from Thermo Fisher Scientific and Phytronix Technologies.

5.5 Supporting information

Text S1. Analysis of total microcystins via Lemieux-von Rudloff oxidation.

Figure S1. UHPLC-HRMS chromatograms of FMOC-derivatized BMAA isomers (AEG, BAMA, BMAA, and DAB) spiked at 50 ng L⁻¹ in blank lake water. The lower pane shows the corresponding isotope-labeled internal standard (ILIS: BMAA-D3) spiked at 500 ng L⁻¹.

Figure S2. Principal component analysis (PCA) correlation circle of active variables (total MCs, AEG, DAB) and additional environmental variables superimposed on the plot (red font dotted arrows) for the PLSF site. The PCA is applied to a subset of n = 64 samples (two outliers removed). Chlorophyll-a data were not available for all time points and therefore could not be included in the statistical analysis.

Table S1. Details on the UHPLC-HRMS instrumental method for the analysis of FMOC-derivatized BMAA and its isomers.

Table S2. Details on the UHPLC-MS/MS instrumental method for the analysis of total microcystins via oxidative cleavage (MMPB method).

Table S3. Measured concentrations (ng L⁻¹) of AEG, BAMA, BMAA, and DAB in samples of freshwater lakes and reservoirs, with or without amendment of 0.1M TCA.

Text S1. Analysis of total microcystins via Lemieux-von Rudloff oxidation.

Surface water samples from two high-intensity monitoring sites were also analyzed for total microcystins (Σ MC). The method was based on Lemieux-von Rudloff oxidation,¹ which generates 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) upon cleavage of the ADDA moiety common to most microcystins and nodularins. We used a previously optimized and validated method,² with minor modifications. Environmental water samples (freshwater lakes and reservoirs) were amended with potassium permanganate and sodium periodate (50 mM each) and adjusted to pH 9 using potassium carbonate. The oxidation reaction proceeded for 60 min under magnetic stirring, after which samples were quenched with sodium bisulfite. Samples were amended with the isotope-labeled internal standard (ILIS: D3-MMPB, 100 ng L⁻¹) and passed through nylon filters (0.22 μ m). A 1-mL aliquot of the oxidized samples was analyzed by on-line solid-phase extraction (on-line SPE) coupled to ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (Thermo TSQ Quantiva UHPLC-MS/MS). Details on the applied chromatographic gradient programs and other instrumental settings are provided in SI Table S2.

The method limit of detection (LOD) was 5 ng L⁻¹ in terms of Σ MC equivalents. A matrix-matched calibration curve (constructed in matrix-free lake water) was used for quantification, using spikes of a MC mixture before oxidation. We participated in a recreational water interlaboratory proficiency study with Abraxis/Eurofins. The determined Σ MC concentrations in the split samples analyzed by the in-house method was within $\pm 30\%$ of the consensus value.

¹ Wu, X., Xiao, B., Li, R., Wang, Z., Chen, X., & Chen, X. (2009). Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 651(2), 241-247.

² Munoz, G., Duy, S. V., Roy-Lachapelle, A., Husk, B., & Sauvé, S. (2017). Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1516, 9-20.

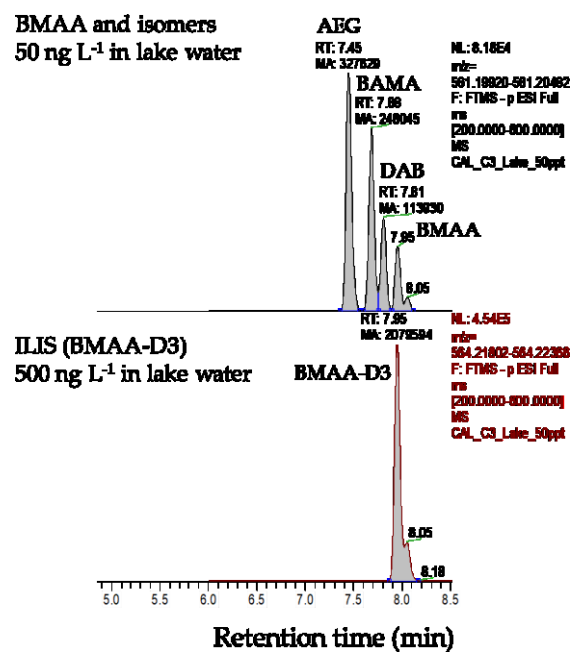


Figure S1. UHPLC-HRMS chromatograms of FMOC-derivatized BMAA isomers (AEG, BAMA, BMAA, and DAB) spiked at 50 ng L⁻¹ in blank lake water. The lower pane shows the corresponding isotope-labeled internal standard (ILIS: BMAA-D3) spiked at 500 ng L⁻¹.

Table S1. Details on the UHPLC-HRMS instrumental method for the analysis of FMOC-derivatized BMAA and its isomers.

Instrument	Thermo Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer Dionex Ultimate 3400 UHPLC chain		
Ionization	Electrospray ionization source, negative ion mode		
Acquisition mode	Full Scan MS (<i>m/z</i> 200-600)		
Analytical column	Thermo Hypersil Gold C18 column (100 × 2.1 mm; 1.9 μm)		
Column Temperature	35°C		
Analytical Mobile Phases	A: 2.5 mM ammonium acetate in HPLC-water B: acetonitrile		
UHPLC gradient program	Time (min)	% B	Flow rate (μL/min)
	0.0	25	450
	2.0	25	450
	4.0	40	450
	8.0	50	450
	8.4	95	450
	9.4	95	450
	9.5	25	450
	10	25	450
Injection Volume	1000 μL (on-line SPE)		
On-line SPE column	Thermo HyperSep Retain PEP column (20 mm × 2.1 mm, 40–60 μm)		
On-line SPE Mobile Phases	A: HPLC-water B: acetonitrile		
On-line SPE gradient program	Time (min)	% B	Flow rate (μL/min)
	0.0	0	1500
	2.0	0	1500
	2.1	100	1500
	6.9	100	1500
	7.0	0	1500
	10	0	1500
Source/gas parameters	Sheath gas flow rate 55 Aux gas flow rate 10 Sweep gas flow rate 0		

	Spray voltage (kV) -3.5 Capillary temperature (°C) 350 Vaporizer temperature (°C) 400 S-lens RF level 60		
Orbitrap parameters	Resolution setting of 70,000 FWHM at <i>m/z</i> 200 AGC target 3e6 Maximum Inject Time (ms) 100		
Data processing	<i>m/z</i>	Retention time (min)	
	AEG (FMOC)	561.20201	7.45
	BAMA (FMOC)	561.20201	7.68
	BMAA (FMOC)	561.20201	7.95
	DAB (FMOC)	561.20201	7.81
	D3-BMAA (FMOC)	564.22084	7.95

Table S2. Details on the UHPLC-MS/MS instrumental method for the analysis of total microcystins via oxidative cleavage (MMPB method).

Instrument	Thermo TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer Accela UHPLC chain		
Ionization	Electrospray ionization source, negative ion mode		
Acquisition mode	Selected reaction monitoring (SRM mode)		
Analytical column	Thermo Hypersil Gold C18 column (50 × 2.1 mm; 1.9 μm)		
Column Temperature	50°C		
Analytical Mobile Phases	A: HPLC-water B: methanol		
UHPLC gradient program	Time (min)	% B	Flow rate (μL/min)
	0.0	60	500
	2.0	60	500
	4.2	100	500
	5.6	100	500
	5.7	60	500
	6.0	60	500
Injection Volume	1000 μL (on-line SPE)		
On-line SPE column	Thermo HyperSep Retain PEP column (20 mm × 2.1 mm, 40–60 μm)		
On-line SPE Mobile Phases	A: HPLC-water + 0.5% formic acid B: methanol + 0.5%formic acid		
On-line SPE gradient program	Time (min)	% B	Flow rate (μL/min)
	0.0	0	1000
	2.0	0	1000
	2.1	100	1500
	4.1	100	1500
	4.2	0	1500
	6.0	0	1500
Source/gas parameters	Sheath gas pressure 35 a.u. Aux gas pressure 15 a.u. Sweep gas pressure 0 a.u. Spray voltage (kV) -2.8 Ion transfer tube temperature (°C) 350		

	Vaporizer temperature (°C) 400		
MS/MS acquisition parameters	Dwell time 30 ms		
	Q1 and Q3 operated at a resolution of 0.7 Da FWHM		
	Q2 collision gas (CID) pressure (mTorr) 1.5		
	Tube lens (V) 43		
	Collision energy (V) 12		
		<i>MS/MS transition</i>	Retention time (min)
	MMPB	207 → 131	2.90
	D3-MMPB	210 → 131	2.90

Table S3. Measured concentrations (ng L⁻¹) of AEG, BAMA, BMAA, and DAB in freshwater lakes and reservoirs samples, with or without amendment of 0.1M TCA.

	AEG (ng L ⁻¹)		BAMA (ng L ⁻¹)		BMAA (ng L ⁻¹)		DAB (ng L ⁻¹)	
	Without TCA	With TCA	Without TCA	With TCA	Without TCA	With TCA	Without TCA	With TCA
TCA-test_SW-001	ND	ND	ND	ND	ND	ND	177	163
TCA-test_SW-002	31	92	ND	53	ND	ND	54	55
TCA-test_SW-003	42	52	ND	52	ND	ND	51	53
TCA-test_SW-004	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-005	ND	12	ND	ND	ND	ND	ND	81
TCA-test_SW-006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-007	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND	20
TCA-test_SW-008	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-009	12	8	ND	ND	ND	ND	ND	21
TCA-test_SW-010	ND	15	ND	ND	ND	ND	ND	21
TCA-test_SW-011	ND	225	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-012	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31
TCA-test_SW-013	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21
TCA-test_SW-014	ND	55	ND	ND	ND	ND	ND	18
TCA-test_SW-015	27	64	ND	ND	ND	ND	ND	28
TCA-test_SW-016	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-017	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24
TCA-test_SW-018	ND	15	ND	45	ND	ND	ND	19

TCA-test_SW-019	27	43	ND	ND	ND	ND	ND	20
TCA-test_SW-020	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20
TCA-test_SW-021	ND	21	ND	ND	ND	ND	ND	21
TCA-test_SW-022	ND	34	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-023	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	26
TCA-test_SW-024	ND	518	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-025	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20
TCA-test_SW-026	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-027	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-028	ND	ND	ND	ND	ND	ND	43	70
TCA-test_SW-029	ND	ND	ND	ND	ND	ND	46	51
TCA-test_SW-030	ND	ND	ND	ND	ND	ND	51	66
TCA-test_SW-031	ND	34	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-032	ND	72	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-033	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-034	ND	ND	ND	ND	ND	ND	47	52
TCA-test_SW-035	ND	ND	ND	ND	ND	ND	51	67
TCA-test_SW-036	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-037	ND	ND	ND	29	ND	ND	ND	32
TCA-test_SW-038	ND	ND	ND	ND	ND	ND	85	64
TCA-test_SW-039	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53

TCA-test_SW-040	ND	35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-041	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-042	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-043	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-044	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-045	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-046	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	109
TCA-test_SW-047	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-048	ND	ND	ND	ND	ND	ND	34	45
TCA-test_SW-049	83	74	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-050	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-051	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-052	ND	ND	ND	ND	ND	ND	178	208
TCA-test_SW-053	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	45
TCA-test_SW-054	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-055	ND	10	ND	ND	ND	ND	ND	55
TCA-test_SW-056	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32	45
TCA-test_SW-057	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-058	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19	27
TCA-test_SW-059	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-060	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

TCA-test_SW-061	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-062	51	78	ND	ND	ND	ND	35	50
TCA-test_SW-063	ND	33	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-064	ND	37	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-065	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-066	ND	39	ND	ND	ND	ND	ND	15
TCA-test_SW-067	ND	ND	ND	ND	ND	ND	72	255
TCA-test_SW-068	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-069	47	ND	ND	ND	ND	ND	75	52
TCA-test_SW-070	81	432	ND	ND	ND	ND	139	117
TCA-test_SW-071	22	99	ND	16	ND	ND	ND	37
TCA-test_SW-072	18	144	ND	50	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-073	64	233	57	43	ND	ND	86	111
TCA-test_SW-074	ND	58	21	ND	ND	ND	49	61
TCA-test_SW-075	ND	38	ND	ND	ND	ND	32	66
TCA-test_SW-076	57	71	ND	33	ND	ND	56	59
TCA-test_SW-077	24	100	ND	53	ND	ND	62	85
TCA-test_SW-078	35	62	ND	53	ND	ND	34	95
TCA-test_SW-079	ND	49	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-080	76	158	ND	38	ND	ND	112	81
TCA-test_SW-081	69	131	ND	33	ND	ND	79	83

TCA-test_SW-082	ND	75	ND	31	ND	ND	ND	66
TCA-test_SW-083	28	94	ND	56	ND	ND	ND	64
TCA-test_SW-084	22	71	ND	53	ND	ND	43	59
TCA-test_SW-085	45	192	57	53	ND	ND	73	119
TCA-test_SW-086	29	54	ND	24	ND	ND	49	55
TCA-test_SW-087	59	172	59	54	ND	ND	87	78
TCA-test_SW-088	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	27
TCA-test_SW-089	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-090	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	16
TCA-test_SW-091	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12
TCA-test_SW-092	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-093	3591	18814	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-094	ND	37	ND	33	ND	ND	ND	57
TCA-test_SW-095	ND	ND	ND	ND	ND	ND	133	136
TCA-test_SW-096	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-097	5	35	ND	52	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-098	ND	35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-099	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	27
TCA-test_SW-100	ND	58	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-101	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

TCA-test_SW-103	ND	11	ND	ND	ND	ND	ND	30
TCA-test_SW-104	ND	16	ND	ND	ND	ND	ND	33
TCA-test_SW-105	15	20	ND	ND	ND	ND	39	27
TCA-test_SW-106	ND	ND	ND	ND	ND	ND	43	49
TCA-test_SW-107	5	43	ND	ND	ND	ND	ND	52
TCA-test_SW-108	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-109	ND	34	ND	ND	ND	ND	ND	53
TCA-test_SW-110	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-111	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-112	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-113	ND	33	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-114	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18
TCA-test_SW-115	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25	32
TCA-test_SW-116	ND	ND	ND	ND	ND	ND	113	237
TCA-test_SW-117	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10	58
TCA-test_SW-118	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	29
TCA-test_SW-119	ND	34	ND	ND	ND	ND	330	359
TCA-test_SW-120	28	65	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-121	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12	22
TCA-test_SW-122	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14	30
TCA-test_SW-123	ND	ND	ND	45	ND	ND	42	39

TCA-test_SW-124	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41	35
TCA-test_SW-125	139	133	ND	53	ND	ND	78	105
TCA-test_SW-126	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16	32
TCA-test_SW-127	ND	ND	ND	ND	ND	ND	79	181
TCA-test_SW-128	ND	ND	ND	ND	ND	ND	107	171
TCA-test_SW-129	ND	35	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-130	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-131	ND	ND	ND	ND	ND	ND	46	45
TCA-test_SW-132	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	32
TCA-test_SW-133	ND	51	ND	ND	ND	ND	13	201
TCA-test_SW-134	ND	49	ND	55	ND	ND	89	87
TCA-test_SW-135	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-136	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53
TCA-test_SW-137	ND	34	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-138	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-139	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-140	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56
TCA-test_SW-141	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-142	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24	88
TCA-test_SW-143	ND	178	ND	ND	ND	ND	81	230
TCA-test_SW-144	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

TCA-test_SW-145	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-146	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-147	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-148	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-149	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TCA-test_SW-150	ND	ND	ND	ND	ND	ND	610	1261
TCA-test_SW-151	ND	ND	ND	ND	ND	ND	45	46
TCA-test_SW-152	ND	7	ND	ND	ND	ND	ND	19
TCA-test_SW-153	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35
TCA-test_SW-154	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28
TCA-test_SW-155	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23
TCA-test_SW-156	28	20	ND	ND	ND	ND	ND	36
TCA-test_SW-157	ND	6	ND	ND	ND	ND	ND	23
TCA-test_SW-158	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32	39

ND: Non-detect data. Limits of detection were 5 ng L⁻¹ for AEG and 10 ng L⁻¹ for BAMA, BMAA, and DAB.

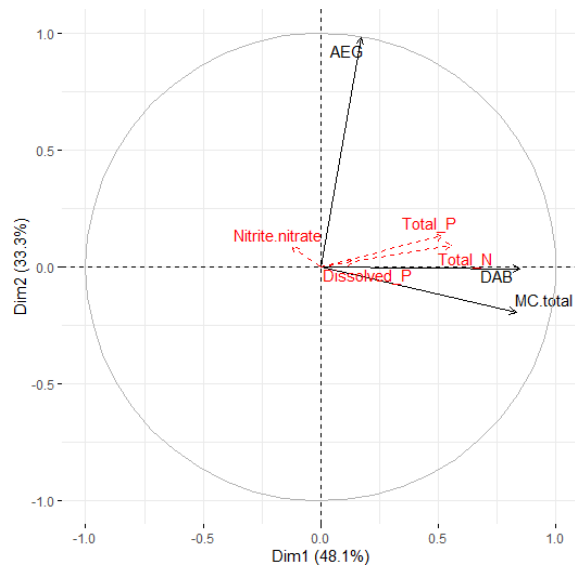


Figure S2. Principal component analysis (PCA) correlation circle of active variables (total MCs, AEG, DAB) and additional environmental variables superimposed on the plot (red font dotted arrows) for the PLSF site. The PCA is applied to a subset of $n = 64$ samples (two outliers removed). Chlorophyll-a data were not available for all time points and therefore could not be included in the statistical analysis.

Chapitre 6. Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué les variations des isomères de BMAA dans les échantillons de cours d'eau avec deux protocoles différents. Nous avons observé que les procédures publiées précédemment qui n'impliquaient pas l'ajout de TCA pouvaient conduire à des niveaux plus faibles de concentrations d'isomères de BMAA. L'ampleur de la différence était variable selon la source de l'eau et la variation saisonnière mais pouvait atteindre des valeurs aussi élevées que 15 fois pour la méthode TCA (et une différence d'ampleur maximale observée de +15 000 ng/L pour l'AEG). La concentration standard de TCA utilisée dans notre étude est en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature sur l'analyse des BMAA dans les solides, tels que les graines de cycadales, les coquillages et les cyanobactéries en poudre. La procédure décrite ici peut encore nécessiter un traitement supplémentaire, y compris l'optimisation de la concentration de TCA [11] ou l'étude de l'hydrolyse dans des conditions plus fortes, comme le HCl concentré ou la chaleur [10]. Puisque notre méthode actuelle implique la dérivation et l'injection d'un grand volume (1 mL) en ligne SPE - UHPLC-HRMS, il n'a pas été jugé possible d'inclure une étape d'hydrolyse au HCl 6M de l'eau en vrac. Pour éviter une dilution importante de l'échantillon, l'essai d'une étape d'hydrolyse plus sévère nécessiterait probablement une lyophilisation préventive des aliquotes d'eau du lac avant leur reconstitution dans un petit volume de HCl concentré.

La méthode TCA a été appliquée à un large ensemble d'échantillons d'eau prélevés sur le terrain en Amérique et en Europe (n total = 390). La BMAA n'a été trouvée (LOD de 10 ng L⁻¹) dans aucun des 45 lacs surveillés pendant la saison de prolifération, tandis que deux de ses isomères, l'AEG et le DAB, pouvaient atteindre des concentrations maximales de l'ordre du µg L⁻¹. Les résultats de la présente étude et de quelques autres [3] [9] [53] [54] [112] indiquent que la BMAA pourrait être moins fréquente dans les efflorescences algales cyanobactériennes d'eau douce qu'on

ne le pensait auparavant. Alors que le DAB peut présenter des effets neurotoxiques similaires à ceux de la BMAA [113], des essais biologiques *in vitro* suggèrent que l'AEG pourrait être moins toxique que la BMAA et le DAB [114] [115]. Bien qu'il n'existe actuellement aucune recommandation concernant la présence de BMAA dans l'eau, nous constatons que les concentrations maximales de microcystines totales dépassent de loin les niveaux provisoires recommandés pour l'eau potable dans l'un des lacs visés par la surveillance saisonnière.

Dans le cadre de futurs travaux et avec quelques modifications de la préparation des échantillons ou des procédures instrumentales, la méthode sensible pourrait être appliquée dans des projets similaires pour l'étude des isomères de la BMAA dans les poissons, les crustacés et les compléments alimentaires à base de spiruline. Les futures études de surveillance et d'évaluation des risques liés aux cyanotoxines dans les écosystèmes d'eau douce et marins touchés par les efflorescences devraient de préférence inclure l'analyse des isomères de la BMAA ainsi que d'autres cyanotoxines, et l'analyse taxonomique du phytoplancton.

Références

1. Yan, B., et al., *Impact factors on the production of β -methylamino-L-alanine (BMAA) by cyanobacteria*. Chemosphere, 2020. **243**: p. 125355.
2. Manolidi, K., et al., *Neurotoxin BMAA and its isomeric amino acids in cyanobacteria and cyanobacteria-based food supplements*. Journal of Hazardous Materials, 2019. **365**: p. 346-365.
3. Main, B.J., et al., *Detection of the suspected neurotoxin β -methylamino-L-alanine (BMAA) in cyanobacterial blooms from multiple water bodies in Eastern Australia*. Harmful Algae, 2018. **74**: p. 10-18.
4. Esterhuizen, M. and T.G. Downing, *β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008. **71**(2): p. 309-313.
5. Banack, S., et al., *Production of the Neurotoxin BMAA by a Marine Cyanobacterium*. Marine Drugs, 2007. **5**(4): p. 180-196.
6. Mondo, K., et al., *Cyanobacterial Neurotoxin β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) in Shark Fins*. Marine Drugs, 2012. **10**(12): p. 509-520.
7. Cohen, S.A., *Analytical techniques for the detection of α -amino- β -methylaminopropionic acid*. The Analyst, 2012. **137**(9): p. 1991.
8. Bishop, S.L. and S.J. Murch, *A systematic review of analytical methods for the detection and quantification of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA)*. The Analyst, 2020. **145**(1): p. 13-28.
9. Al-Sammak, M.A., et al., *Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants*. Toxins, 2014. **6**(2): p. 488-508.
10. Faassen, E.J., et al., *A collaborative evaluation of LC-MS/MS based methods for BMAA analysis: Soluble bound BMAA found to be an important fraction*. Marine drugs, 2016. **14**(3): p. 45.
11. Lage, S., et al., *BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose?* Environmental Science and Pollution Research, 2016. **23**(1): p. 338-350.
12. Beach, D.G., et al., *Differential Mobility-Mass Spectrometry Double Spike Isotope Dilution Study of Release of β -Methylaminoalanine and Proteinogenic Amino Acids during Biological Sample Hydrolysis*. Scientific Reports, 2018. **8**(1).
13. Karamyan, V.T. and R.C. Speth, *Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review*. Life Sciences, 2008. **82**(5): p. 233-246.
14. Rao, S.D., et al., *BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation*. Experimental Neurology, 2006. **201**(1): p. 244-252.
15. Nunes-Costa, D., et al., *Microbial BMAA and the Pathway for Parkinson's Disease Neurodegeneration*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2020. **12**.
16. Whiting, M.G., *Toxicity of cycads: implications for neurodegenerative diseases and cancer*. 1988: Third World Medical Research Foundation in collaboration with Lyon Arboretum
17. Vega, A., E. Bell, and P. Nunn, *The preparation of L-and D- α -amino- β -methylaminopropionic acids and the identification of the compound isolated from *Cycas circinalis* as the L-isomer*. Phytochemistry, 1968. **7**(10): p. 1885-1887.
18. Polsky, F., P. Nunn, and E. Bell. *Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid*. in *Federation proceedings*. 1972.
19. Ross, S.M. and P.S. Spencer, *Specific antagonism of behavioral action of "uncommon" amino acids linked to motor-system diseases*. Synapse, 1987. **1**(3): p. 248-253.
20. Spencer, P.S., et al., *Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin*. Science, 1987. **237**(4814): p. 517-522.
21. Schaumburg, H., *Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins*. Selective Neuronal Death, 1987: p. 221.
22. Perry, T.L., et al., *β -N-Methylamino-L-alanine: chronic oral administration is not neurotoxic to mice*. Journal of the neurological sciences, 1989. **94**(1-3): p. 173-180.

23. Seawright, A.A., et al., *Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-β-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats*. *Neuropathology and applied neurobiology*, 1990. **16**(2): p. 153-169.
24. Smith, S.E. and B.S. Meldrum, *Receptor site specificity for the acute effects of β-N-methylamino-alanine in mice*. *European journal of pharmacology*, 1990. **187**(1): p. 131-134.
25. Lindström, H., et al., *Plant-Derived Neurotoxic Amino Acids (β-N-Oxalylamino-l-Alanine and β-N-Methylamino-l-Alanine): Effects on Central Monoamine Neurons*. *Journal of neurochemistry*, 1990. **55**(3): p. 941-949.
26. Rakonczay, Z., Y. Matsuoka, and E. Giacobini, *Effects of L-β-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat*. *Journal of Neuroscience Research*, 1991. **29**(1): p. 121-126.
27. Matsuoka, Y., et al., *L-β-methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1993. **44**(3): p. 727-734.
28. Chang, Y.-C., S.-J. Chiu, and K.-P. Kao, *beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats*. *The Chinese journal of physiology*, 1993. **36**(2): p. 79-84.
29. Dawson Jr, R., et al., *Neurochemical and neurobehavioral effects of neonatal administration of β-N-methylamino-l-alanine and 3, 3'-Iminodipropionitrile*. *Neurotoxicology and teratology*, 1998. **20**(2): p. 181-192.
30. Cruz-Aguado, R., D. Winkler, and C.A. Shaw, *Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary β-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2006. **84**(2): p. 294-299.
31. Santiago, M., et al., *Acute perfusion of BMAA in the rat's striatum by in vivo microdialysis*. *Toxicology letters*, 2006. **167**(1): p. 34-39.
32. Buenz, E.J. and C.L. Howe, *Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo*. *Neurotoxicology*, 2007. **28**(3): p. 702-704.
33. Kazemi Shariat Panahi, H., et al., *Neuropathological Mechanisms of β-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) with a Focus on Iron Overload and Ferroptosis*. *Neurotoxicity Research*, 2022: p. 1-22.
34. Jiang, L., et al., *Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **403**(6): p. 1719-1730.
35. Tymm, F.J.M., S.L. Bishop, and S.J. Murch, *A Single Laboratory Validation for the Analysis of Underivatized β-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA)*. *Neurotoxicity Research*, 2021. **39**(1): p. 49-71.
36. Fan, H., et al., *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*, 2015. **22**(8): p. 5943-5951.
37. Stafforst, T. and U. Diederichsen, *Solid-Phase Synthesis of Acid-Sensitive N-(2-Aminoethyl)glycine-PNA Oligomers by the Fmoc/Bhoc Strategy*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2007. **2007**(4): p. 681-688.
38. Banack, S.A., et al., *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**(11): p. e49043.
39. Gallo-Torres, H.E., et al., *The gastrointestinal absorption, tissue distribution, urinary excretion and metabolism of N-(2-aminoethyl)-glycine (AEG) in the rat*. *Life Sciences*, 1980. **27**(24): p. 2347-2357.
40. Brand, L.E., et al., *Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-l-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs*. *Harmful Algae*, 2010. **9**(6): p. 620-635.
41. Jiang, L., et al., *Quantification of neurotoxin BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets*. *Scientific Reports*, 2015. **4**(1): p. 6931.

42. Downing, S., et al., *The fate of the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine in freshwater mussels*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014. **101**: p. 51-58.
43. Contardo-Jara, V., T. Schwanemann, and S. Pflugmacher, *Uptake of a cyanotoxin, β -N-methylamino-L-alanine, by wheat (*Triticum aestivum*)*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014. **104**: p. 127-131.
44. Scott, L. and T. Downing, *β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) Toxicity Is Gender and Exposure-Age Dependent in Rats*. *Toxins*, 2017. **10**(1): p. 16.
45. Delcourt, N., et al., *Toxicité aiguë et chronique de la bêta-méthylamino-L-alanine (BMAA) : aspects moléculaires et cellulaires*. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 2018. **30**(3): p. 176-177.
46. Holtcamp, W., *The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease?* 2012, National Institute of Environmental Health Sciences.
47. Pablo, J., et al., *Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease*. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2009. **120**(4): p. 216-225.
48. Mondo, K., et al., *Environmental neurotoxins β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements*. *Food and Chemical Toxicology*, 2014. **70**: p. 26-32.
49. Lepoutre, A., et al., *Usability of the bivalves *Dreissena polymorpha* and *Anodonta anatina* for a biosurvey of the neurotoxin BMAA in freshwater ecosystems*. *Environmental Pollution*, 2020. **259**: p. 113885.
50. Lance, E., et al., *Occurrence of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans*. *Toxins*, 2018. **10**(2): p. 83.
51. Faassen, E.J., *Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: what do we really know?* *Toxins*, 2014. **6**(3): p. 1109-1138.
52. Metcalf, J.S., et al., *Public health responses to toxic cyanobacterial blooms: perspectives from the 2016 Florida event*. *Water Policy*, 2018. **20**(5): p. 919-932.
53. Chatziefthimiou, A.D., et al., *Analysis of Neurotoxic Amino Acids from Marine Waters, Microbial Mats, and Seafood Destined for Human Consumption in the Arabian Gulf*. *Neurotoxicity research*, 2018. **33**(1): p. 143-152.
54. Bishop, S.L., et al., *N- β -Methylamino-L-Alanine and Its Naturally Occurring Isomers in Cyanobacterial Blooms in Lake Winnipeg*. *Neurotoxicity research*, 2018. **33**(1): p. 133-142.
55. Pip, E., K. Munford, and L. Bowman, *Seasonal nearshore occurrence of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in Lake Winnipeg, Canada*. *Environ. Pollut*, 2016. **5**: p. 110-118.
56. Roy-Lachapelle, A., M. Sollicec, and S. Sauvé, *Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015. **407**(18): p. 5487-5501.
57. Faassen, E.J., W. Beekman, and M. Lürling, *Evaluation of a Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Surface Waters*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(6): p. e65260.
58. Tymms, F.J., S.L. Bishop, and S.J. Murch, *A single laboratory validation for the analysis of underivatized β -N-methylamino-L-alanine (BMAA)*. *Neurotoxicity research*, 2021. **39**(1): p. 49-71.
59. Zhang, Y., et al., *Quantitative screening for cyanotoxins in soil and groundwater of agricultural watersheds in Quebec, Canada*. *Chemosphere*, 2021. **274**: p. 129781.
60. Bláhová, L., et al., *Assessment of non-derivatized β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) neurotoxin in free form in urine of patients with nonspecific neurological symptoms*. *Toxicon*, 2017. **133**: p. 48-57.
61. Vo Duy, S., et al., *Analysis of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers in surface water by FMOC derivatization liquid chromatography high resolution mass spectrometry*. *PLOS ONE*, 2019. **14**(8): p. e0220698.

62. Beach, D.G., E.S. Kerrin, and M.A. Quilliam, *Selective quantitation of the neurotoxin BMAA by use of hydrophilic-interaction liquid chromatography–differential mobility spectrometry–tandem mass spectrometry (HILIC–DMS–MS/MS)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**(28): p. 8397-8409.
63. Li, A., et al., *Elucidation of matrix effects and performance of solid-phase extraction for LC-MS/MS analysis of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB) neurotoxins in cyanobacteria*. The Analyst, 2012. **137**(5): p. 1210.
64. Foss, A.J., N. Chernoff, and M.T. Aubel, *The analysis of underivatized β -Methylamino-L-alanine (BMAA), BAMA, AEG & 2,4-DAB in Pteropus mariannus mariannus specimens using HILIC-LC-MS/MS*. Toxicon, 2018. **152**: p. 150-159.
65. Kisby, G.E., D.N. Roy, and P.S. Spencer, *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, 1988. **26**(1): p. 45-54.
66. Duncan, M.W., et al., *Quantification of the Putative Neurotoxin 2-Amino-3-(methylamino)propanoic Acid (BMAA) in Cycadales: Analysis of the Seeds of Some Members of the Family Cycadaceae*. Journal of Analytical Toxicology, 1989. **13**(3): p. 169-175.
67. Kubo, T., et al., *Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, β -N-methylamino-L-alanine*. Toxicon, 2008. **51**(7): p. 1264-1268.
68. Rosén, J. and K.-E. Hellenäs, *Determination of the neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry)*. The Analyst, 2008. **133**(12): p. 1785.
69. Metcalf, J.S., et al., *Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004*. Environmental Microbiology, 2008. **10**(3): p. 702-708.
70. Eriksson, J., et al., *Improving derivatization efficiency of BMAA utilizing AccQ-Tag® in a complex cyanobacterial matrix*. Amino Acids, 2009. **36**(1): p. 43-48.
71. Cox, P.A., et al., *Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans*. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2009. **10**(sup2): p. 109-117.
72. Moura, S., et al., *¹H NMR determination of β -N-methylamino-L-alanine (l-BMAA) in environmental and biological samples*. Toxicon, 2009. **53**(5): p. 578-583.
73. Scott, P.M., et al., *Liquid chromatographic determination of the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine in algae food supplements, freshwater fish, and bottled water*. Journal of Food Protection, 2009. **72**(8): p. 1769-1773.
74. Faassen, E., et al., *Determination of the neurotoxins BMAA and DAB by LC-MS/MS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms*. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2009. **10**(2): p. 79-84.
75. Li, A., et al., *Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China*. Toxicon, 2010. **55**(5): p. 947-953.
76. Spáčil, Z., et al., *Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples*. Analyst, 2010. **135**(1): p. 127-132.
77. Krüger, T., et al., *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**(2-3): p. 547-557.
78. Banack, S.A., et al., *Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB)*. Toxicon, 2010. **56**(6): p. 868-879.
79. Banack, S.A., et al., *Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids*. Toxicon, 2011. **57**(5): p. 730-738.
80. Esterhuizen-Londt, M. and T. Downing, *Solid phase extraction of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from South African water supplies*. Water SA, 2011. **37**(4).

81. Faassen, E.J., F. Gillissen, and M. Lürling, *A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36667.
82. Muñoz-Sáez, E., et al., *Analysis of β -N-methylamino-l-alanine (L-BMAA) neurotoxicity in rat cerebellum*. NeuroToxicology, 2015. **48**: p. 192-205.
83. Metcalf, J.S., et al., *Analysis of BMAA enantiomers in cycads, cyanobacteria, and mammals: in vivo formation and toxicity of d-BMAA*. Amino Acids, 2017. **49**(8): p. 1427-1439.
84. Al-Sammak, M.A., et al., *Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples*. Toxicon, 2013. **76**: p. 316-325.
85. Zou, S., et al., *Simultaneous Determination of Five Alkaloids by HPLC-MS/MS Combined With Micro-SPE in Rat Plasma and Its Application to Pharmacokinetics After Oral Administration of Lotus Leaf Extract*. Frontiers in Pharmacology, 2019. **10**.
86. Mazzoni, M., et al., *An On-Line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Perfluoroalkyl Acids in Drinking and Surface Waters*. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2015. **2015**: p. 1-13.
87. Togola, A., N. Baran, and C. Coureau, *Advantages of online SPE coupled with UPLC/MS/MS for determining the fate of pesticides and pharmaceutical compounds*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(4): p. 1181-1191.
88. Rubakhin, S.S. and J.V. Sweedler, *A Mass Spectrometry Primer for Mass Spectrometry Imaging*. 2010, Humana Press. p. 21-49.
89. Ho, C., et al., *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists, 2003. **24**: p. 3-12.
90. Michalski, A., et al., *Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2011. **10**: p. M111.011015.
91. Scheltema, R.A., et al., *The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-filter, High-performance Quadrupole and an Ultra-high-field Orbitrap Analyzer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(12): p. 3698-3708.
92. Larsen, M.L., et al., *Extreme rainfall drives early onset cyanobacterial bloom*. Facets, 2020. **5**(1): p. 899-920.
93. Silva, T.F., et al., *Impact of urban stormwater runoff on cyanobacteria dynamics in a tropical urban lake*. Water, 2019. **11**(5): p. 946.
94. Khac, V.T., et al., *An automatic monitoring system for high-frequency measuring and real-time management of cyanobacterial blooms in urban water bodies*. Processes, 2018. **6**(2): p. 11.
95. Roy-Lachapelle, A., et al., *Analysis of multiclass cyanotoxins (microcystins, anabaenopeptins, cylindrospermopsin and anatoxins) in lake waters using on-line SPE liquid chromatography high-resolution Orbitrap mass spectrometry*. Analytical Methods, 2019. **11**(41): p. 5289-5300.
96. Dinh, Q.T., et al., *Stability issues of microcystins, anabaenopeptins, anatoxins, and cylindrospermopsin during short-term and long-term storage of surface water and drinking water samples*. Harmful Algae, 2021. **101**: p. 101955.
97. Meriluoto, J., L. Spoof, and G.A. Codd, *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. 2017: Wiley.
98. Huisman, J., et al., *Cyanobacterial blooms*. Nature Reviews Microbiology, 2018. **16**(8): p. 471-483.
99. Lobner, D., et al., *β -N-methylamino-l-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms*. Neurobiology of Disease, 2007. **25**(2): p. 360-366.
100. Snyder, L.R., et al., *Parkinson-dementia complex and development of a new stable isotope dilution assay for BMAA detection in tissue*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009. **240**(2): p. 180-188.

101. Berntzon, L., et al., *Detection of BMAA in the human central nervous system*. Neuroscience, 2015. **292**: p. 137-147.
102. Chang, A.C.G., et al., *Perspectives on Endosymbiosis in Coralloid Roots: Association of Cycads and Cyanobacteria*. Frontiers in Microbiology, 2019. **10**(1888).
103. Jiao, Y., et al., *Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin β -methylamino-L-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk*. Science of The Total Environment, 2014. **468-469**: p. 457-463.
104. Jiang, L., et al., *Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(4): p. 1283-1292.
105. Baptista, M.S., et al., *Determination of the non protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine in estuarine cyanobacteria by capillary electrophoresis*. Toxicon, 2011. **58**(5): p. 410-414.
106. Ibáñez, M., et al., *Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006. **1134**(1): p. 51-55.
107. Yvon, M., C. Chabanet, and J.-P. Péliissier, *Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions Hypothesis on the precipitation mechanism*. International Journal of Peptide and Protein Research, 2009. **34**(3): p. 166-176.
108. D'Silva, L.P., *Biological and physicochemical mechanisms affecting phosphorus and arsenic efflux from prairie reservoir sediment, Buffalo Pound Lake, SK, Canada*. 2017, University of Saskatchewan.
109. Politi, E. and Y.T. Prairie, *The potential of Earth Observation in modelling nutrient loading and water quality in lakes of southern Québec, Canada*. Aquatic Sciences, 2018. **80**(1).
110. Dillenberg, H. and M. Dehnel, *Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959*. Canadian Medical Association Journal, 1960. **83**(22): p. 1151.
111. Tran Khac, V., et al., *An Automatic Monitoring System for High-Frequency Measuring and Real-Time Management of Cyanobacterial Blooms in Urban Water Bodies*. Processes, 2018. **6**(2): p. 11.
112. Munoz, G., et al., *Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2017. **1516**: p. 9-20.
113. Core Team, R., *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2014.
114. Violi, J.P., et al., *Prevalence of β -methylamino-L-alanine (BMAA) and its isomers in freshwater cyanobacteria isolated from eastern Australia*. Ecotoxicology and environmental safety, 2019. **172**: p. 72-81.
115. Weiss, J.H., C.W. Christine, and D.W. Choi, *Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by β -N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds*. Neuron, 1989. **3**(3): p. 321-326.
116. Main, B.J. and K.J. Rodgers, *Assessing the combined toxicity of BMAA and its isomers 2, 4-DAB and AEG in vitro using human neuroblastoma cells*. Neurotoxicity research, 2018. **33**(1): p. 33-42.
117. Metcalf, J., et al., *Neurotoxic amino acids and their isomers in desert environments*. Journal of Arid Environments, 2015. **112**: p. 140-144.