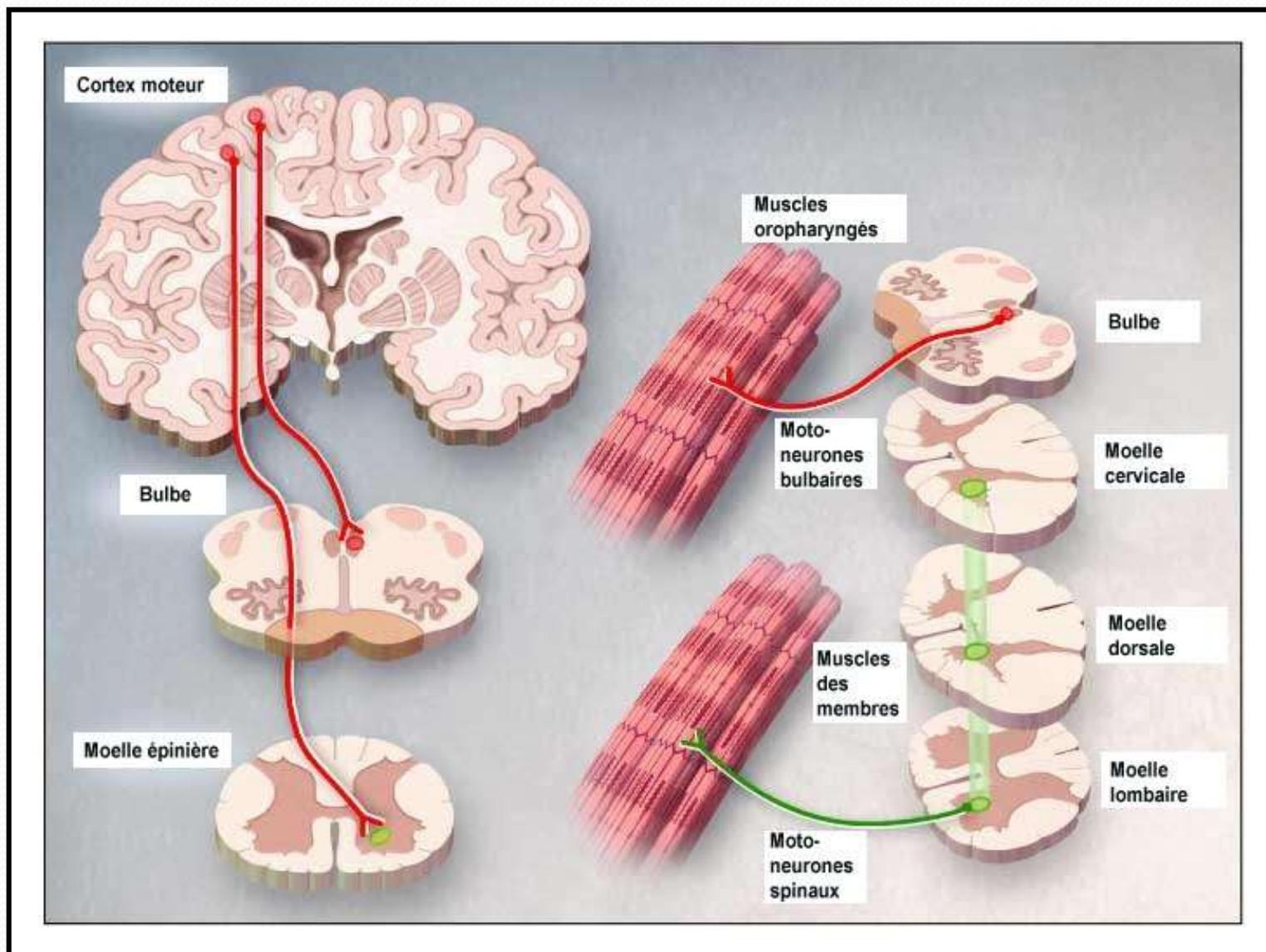


SLA, stress et environnement

Pr W Camu, Centre SLA, Montpellier
CHU et INSERM 1051

Dégénérescence des motoneurones



La SLA, c'est donc ...

- Une paralysie progressive :
 - 4 membres
 - Parole
 - Déglutition
 - Respiration
- En toute conscience
- Conséquences vitales directes :
 - dysphagie
 - insuffisance respiratoire



Atrophie des muscles typique de la maladie

Epidémiologie

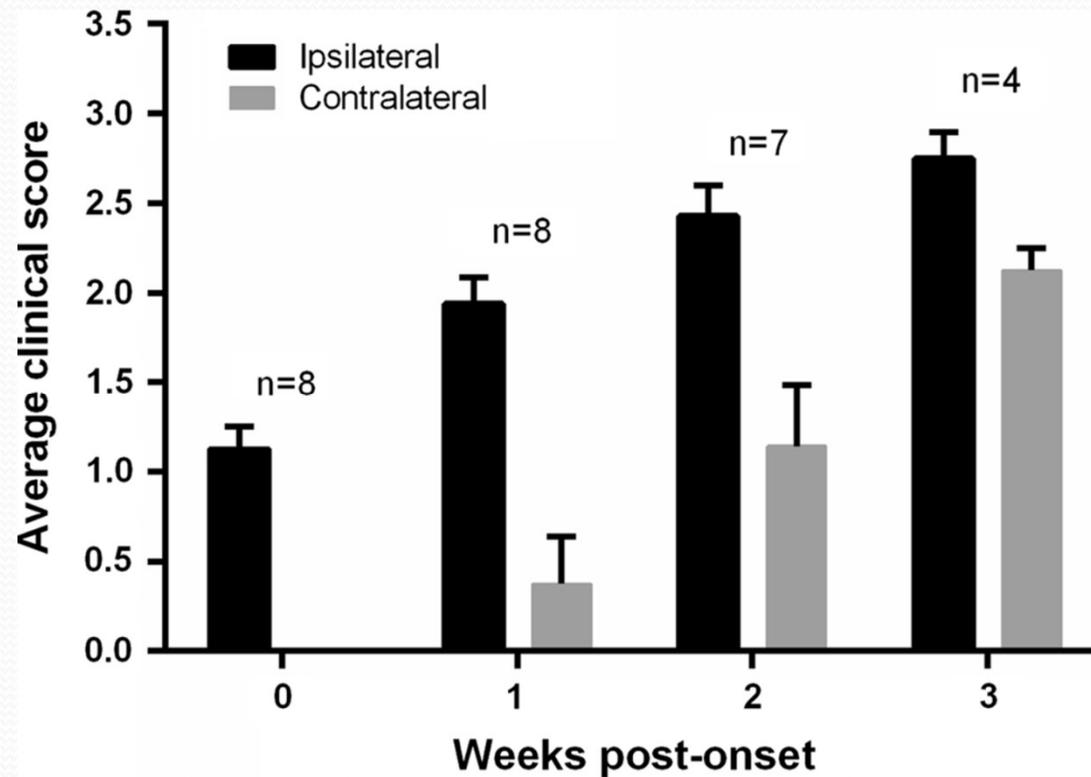
- Incidence : de 2 à 3 / 100 000 habitants (2,57 dans l'Hérault)
 - Une des plus incidentes avant 70 ans
- Prévalence près de 4 à 8 /100 000
- Hommes et femmes
 - Tous les âges adultes, moyenne 64 ans
 - Survie médiane 3 ans [3 mois - > 40 ans]
 - La plus grave des maladies neurologiques
- Ubiquitaire (sauf sur Guam)
- Cas familiaux : 10 à 20 %
- Facteurs de risque

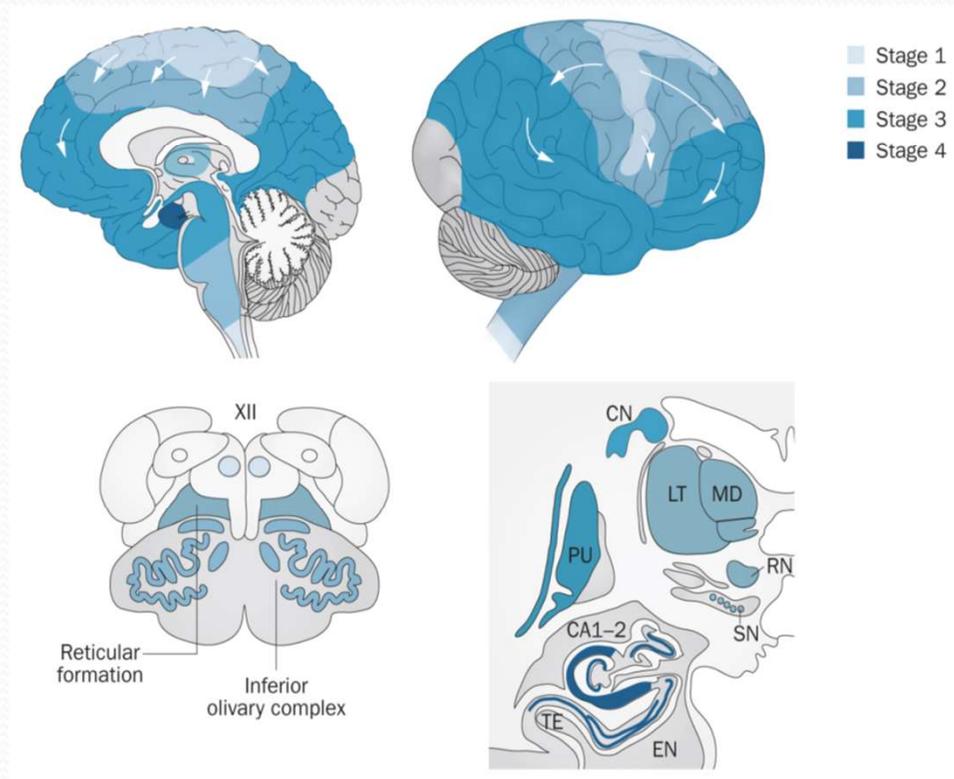
Principal facteur de risque de la SLA :

La maladie des hyperactifs

- Touche particulièrement
 - Professions exposées aux solvants et aux métaux lourds
 - Travail lourd ou physique : maçon, chaudronnier, manutentionnaires, agriculteurs, militaires
 - Sportifs, réguliers, intensifs :
 - 20 fois plus de risque de SLA chez les marathoniens, les footballeurs pro, les skieurs de fond intensifs etc..

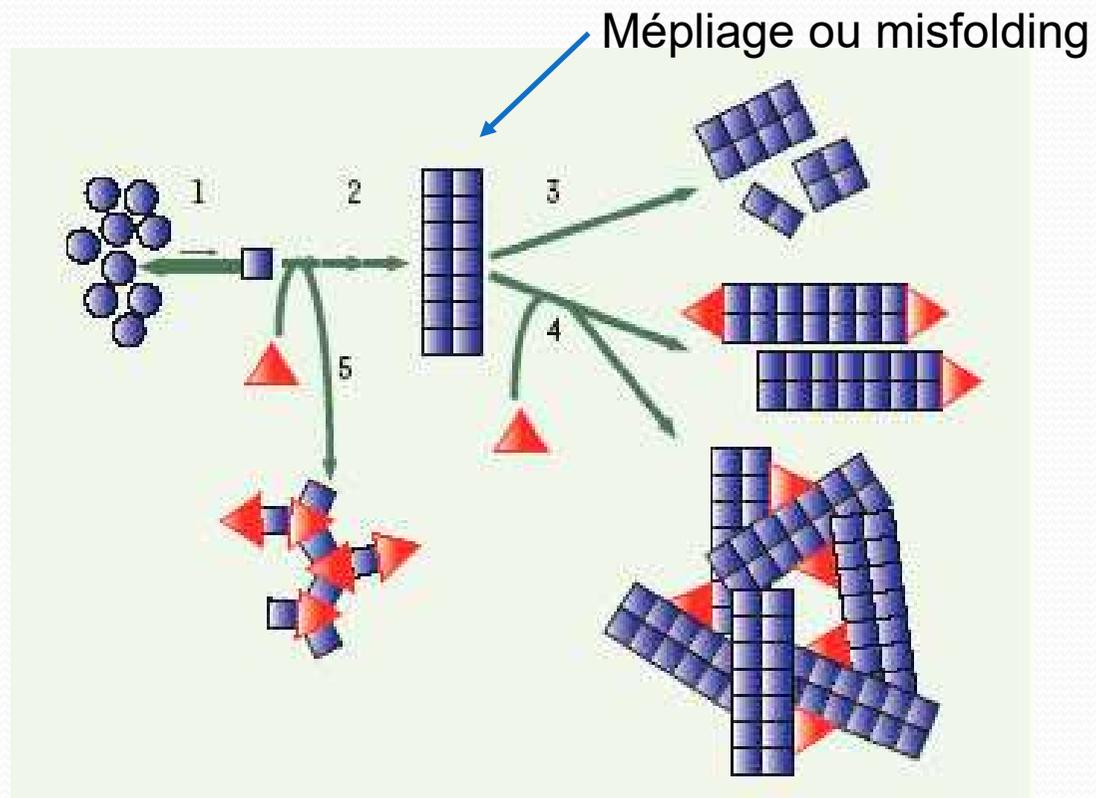
Diffusion de la maladie (Ayers et al., 2015)





- Suggère un processus moléculaire qui diffuse
- Deux grandes possibilités :
 - La microglie s'active en un point puis cette activation se transmet de proche en proche
 - Une protéine est produite par une cellule nerveuse et se propage aux autres cellules

Mécanisme de type prion



SOD1 : candidat logique pour induire une mort des motoneurones

- Le motoneurone
 - Très haut niveau métabolique, fabrication de radicaux libres lors de l'activité
 - Principale enzyme chélatrice des Rx libres : SOD₁
- Génétique
 - Les mutations du gène de SOD₁ induisent une SLA
- Grand facteur de risque
 - L'activité physique
 - Au plus on a d'activité au plus on fabrique SOD₁
 - Au plus on augmente le risque de misfolding de la protéine
- Processus prion
 - Met 20 à 30 ans à finir par donner des symptômes
 - Clinique de la SLA : partie émergée de l'iceberg (les signes apparaissent pour 80% de neurones touchés...)

Quelles causes à ce misfolding ?

- Synthèse de SOD₁ anormale
 - Cas des cas familiaux avec mutation SOD₁, prouvé
- Synthèse de SOD₁ à un haut niveau
 - Relation étroite avec l'activité physique
 - Les patients SLA sont très actifs physiquement
- Altérations chimiques
 - Différents agents chimiques peuvent altérer la structure ou la synthèse protéine
 - Association connue entre SLA et pesticides et formaldéhyde
- Altérations de structure de la protéine
 - Rôle actuellement reconnu pour la BMAA
 - Toxine à l'origine de la forme de Guam

SLA et environnement

- Causes génétiques :
 - 4 gènes majeurs, pour près de 10 gènes identifiés
 - Responsable de 8 % des cas de SLA au total
 - Mais de 80 % des cas héréditaires
- Cause non génétique = environnementale ?
 - > 90 % des cas de SLA
- Vermeulen (2016)
 - 40 % au moins des facteurs étiologiques d'une maladie sont environnementaux

Etudes sur les facteurs environnementaux nombreuses, mais...

- Consensus sur le rôle d'un facteur difficile à obtenir
- Etudes rarement prospectives
- Groupes souvent limités
- SLA = maladie rapide, temps d'observation court
- Exposition peut être lointaine dans le passé
- Les facteurs peuvent être multiples et conjuguer leurs effets

Facteurs environnementaux et SLA

- Métaux lourds : (*Trojsi et al., 2013*)
 - Ont pu être impliqués : Se, Pb, Cd, Al, Hg, Cr, Mg (*Mitchell, 1987*)
 - Mercure et SLA :
 - Souris Tg : mort accélérée en présence de Hg
 - Hg facilite la méthylation de l'ADN (*Bridges et Kalups, 2005*), potentialise la BMAA (*Rush et al., 2012*)
- Champs électromagnétiques
 - Expo champs EM, en suède et en Suisse : RR 2,2 (*Hakansson et al. ; Huss et al., 2014*), mais bases de registres
 - Etude cas-témoins (*Seelen et al., 2014*) : aucune association
- Pollution, fumées
 - Tabagisme associé à la SLA (*Ingre et al., 2015*), Cd, Pb...
 - Fumée de tabac méthyle l'ADN
 - Pollution atmosphérique
 - Lien entre risque de SLA et taux de NO₂ et PM_{2,5}
- Pesticides et SLA :
 - Méta analyse : RR 1,9 (*Kamel et al., 2012*) ; *Malek et al., 2012* : RR 1,8
 - Organophosphorés : toxicité sur les motoneurones via le blocage de l'Ach estérase
 - Revue Cochrane : 2 études significatives avec RR 2,5 et 1,2

Arguments pour un rôle de l'environnement

- La rareté de la génétique
- Cas similaires dans un même environnement :
 - Cas conjugaux de SLA (*Corcia et al., 2003*)
 - Cas chez des colocataires
 - Cas chez des professionnels dans un même lieu :
 - Enseignants utilisant la même classe (*Hyzer et al., 1987*)
 - Chercheurs dans un même labo (*Camu, données personnelles*)
 - Travailleurs dans une fabrique de robinets (*Pradat, dp*)
- Guam....

La forme de l'île de Guam

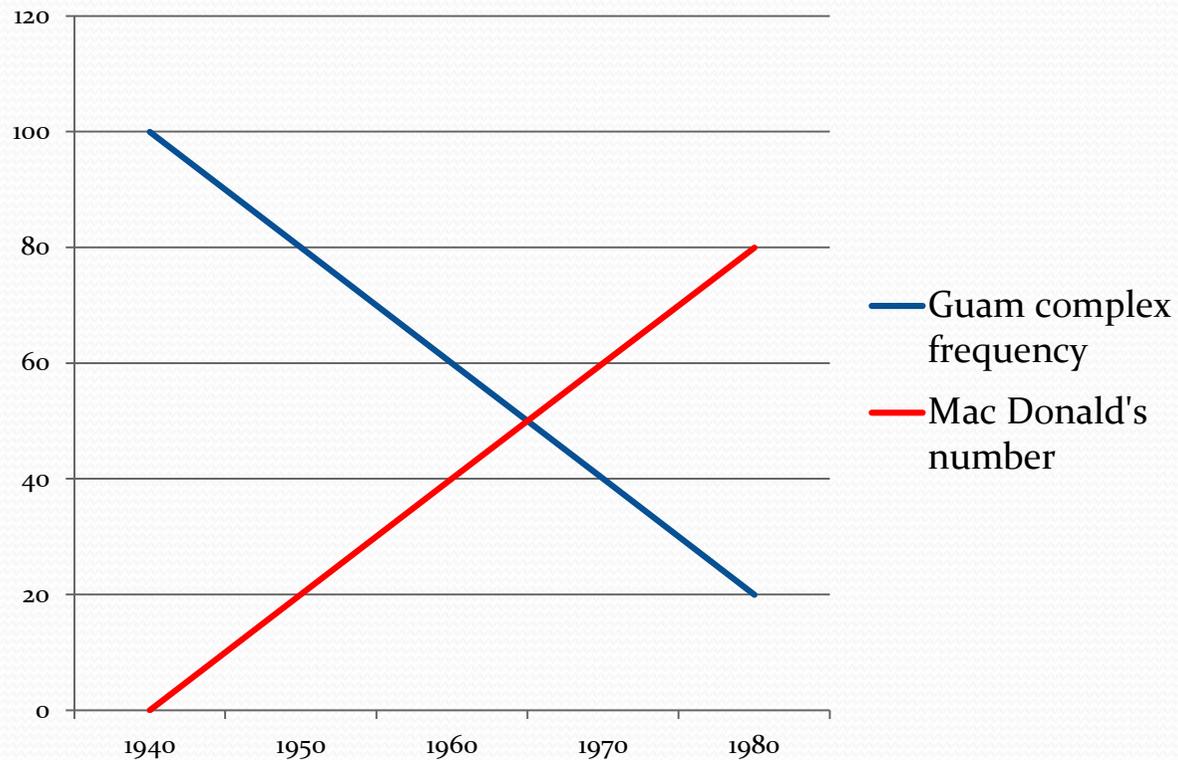
- Années 50 : Service de santé des Armées US
 - Découverte de l'association SLA, démence et Parkinson
 - Les patients peuvent avoir 1, 2 or 3 de ces 3 maladies
 - Epidémiologie
 - Touche hommes et femmes après 40 ans
 - Haute incidence (> 100 fois celle de la SLA ailleurs)
- Années 70-80 : Spencer
 - Etudie les habitudes alimentaires sur Guam
 - Utilisent la graine de Cycad comme farine
 - Le Cycas est un faux palmier qui contient 3 neurotoxines
 - Dont la BMAA

BMAA

- Neurotoxine, similitudes structurelles avec le glutamate
 - chimiquement : agoniste de tous les récepteurs au glutamate
- Spencer (*Science*, 1987) :
 - Des singes nourris avec la BMAA font une SLA
- Controverse
 - Certains humains malades n'ont jamais mangé de farine à base de Cycas
 - Il est considéré que la quantité de BMAA donnée au singe est telle qu'un humain ne peut pas en manger autant durant sa vie entière

Evolution sur Guam

le rôle de l'environnement



- Sur Guam les habitudes alimentaires changent et la maladie diminue de fréquence
- Les migrants au USA ont une incidence qui se normalise en 27 ans

Années 2000

- Paul Cox
 - Constate que des plantes dont la reproduction est dépendante des chauves-souris disparaissent sur Guam
 - Enquête sur Guam
 - En quelques années, les chauves-souris ont totalement disparu, il y en avait plus de 250 000
 - Les Guamamiens les ont mangées
- Hypothèse :
 - Les humains se sont intoxiqués en mangeant les animaux qui stockent les graines

BMAA sur Guam,

Murch et al., 2004 ; *Banack et al., 2006*

- Animaux :
 - Concentrations énormes de BMAA (HPLC) dans les chauves-souris
 - 1 cv consommée = consommation de 1,4 tonnes de graine de cycad
 - Taux très élevés aussi dans les autres animaux qui mangent les graines tombées au sol
 - Cochons, Cerfs, etc..
- Humains :
 - Taux de BMAA très élevés dans le cerveau des patients vs contrôles

D'où vient la BMAA ?

Cox et al., 2005

- BMAA est produite par diverses variétés de cyanobactéries
- Cyanos sont saprophytes des racines
- BMAA est intégrée au niveau des racines et transportée dans la sève
- Puis, elle est stockée/concentrée dans la graine
- Le même mécanisme sera démontré dans divers types de plantes y compris aquatiques

BMAA dans les milieux aquatiques proches de foyers de SLA

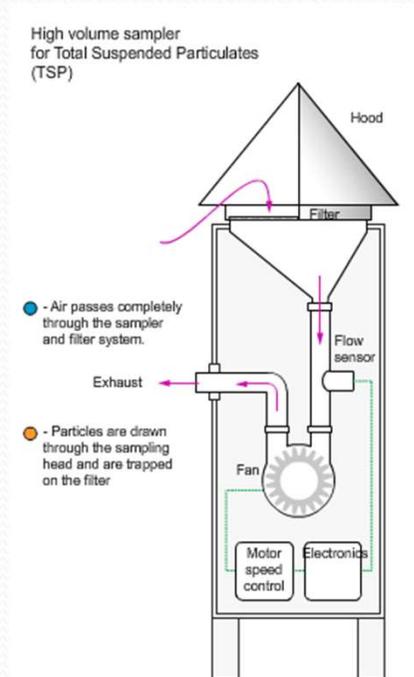
- Caller et al., 2009
 - Enfield, NH, 10 à 25 fois plus de SLA qu'attendu
 - Lake Mascoma à Enfield, fréquents blooms de cyanobactéries
- Brand et al., 2010
 - South Florida
 - BMAA présente dans blooms de cyanos
 - Pêcheurs avec une SLA, mangent beaucoup de homards, qui contiennent des taux très élevés de BMAA
- Field et al., 2013
 - Annapolis, MD, 3 SLA chez des voisins
 - Consommation fréquente de crabes bleus de la Chesapeake bay
 - Taux très élevés de BMAA dans les crabes (bleu = cyanos)

ALS and lakes in the USA *(Caller et al., 2015)*

- Study of the ALS incidence in New Hampshire
 - 2-fold increase surrounding lakes
- Patient questionnaire
 - High consumption of fishes and molluscs
 - Higher incidence is surfers, cross-country skiers and water skiers (4-fold)
- Intense use of snow guns in the area
 - Potential factor for aerosolisation ?

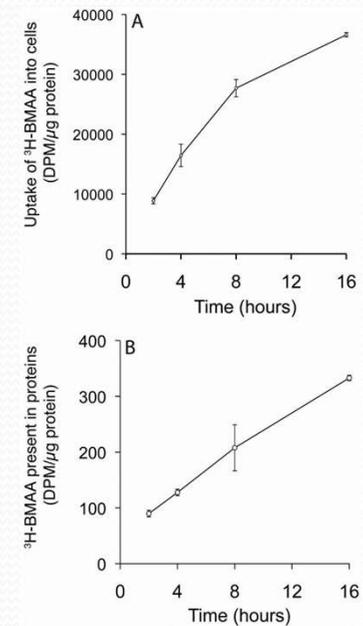
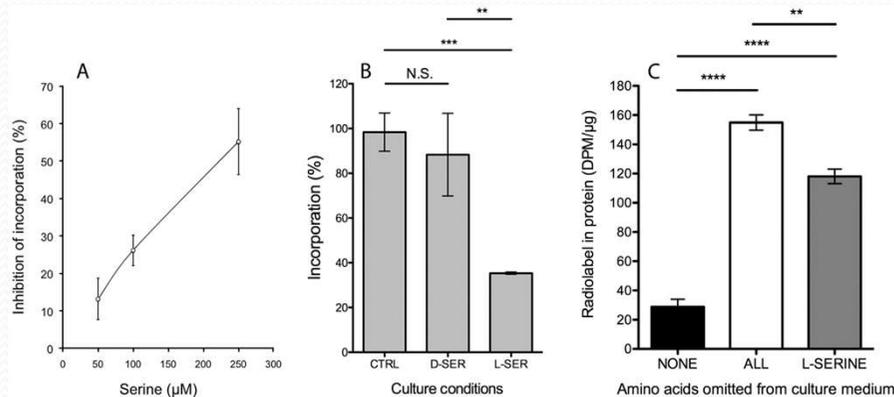
Study of aerosolisation in lake areas

- Use of air samplers with filters to
 - Identify cyanobacteria
 - Measure BMAA and other toxins
- Cyanobacteria were identified
- BMAA was present in air samples
- In presence of wind, it was estimated that BMAA intake could reach 1gr/person/day



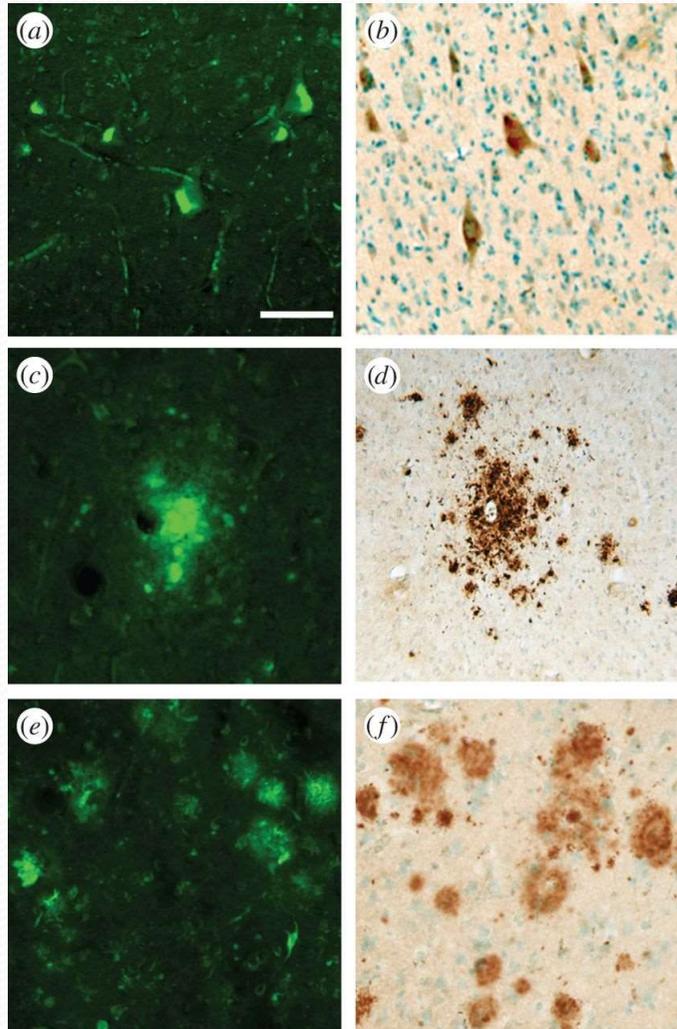
Mode d'action de la BMAA

- Dunlop et al., 2013
 - Incorporée dans les protéines
 - A la place de la Serine, un acide aminé important



- Les chercheurs ont donc eu l'idée de donner de la sérine aux singes puis aux hommes (étude en cours)

BMMA donnée en nourriture aux singes vervets (*Cox et al., 2016*)

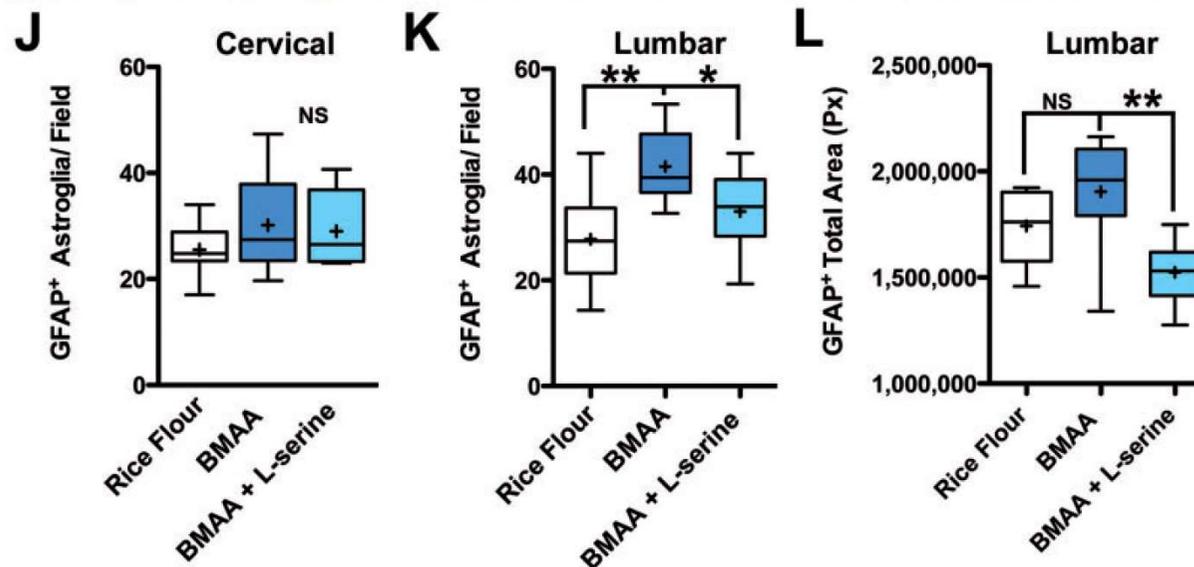
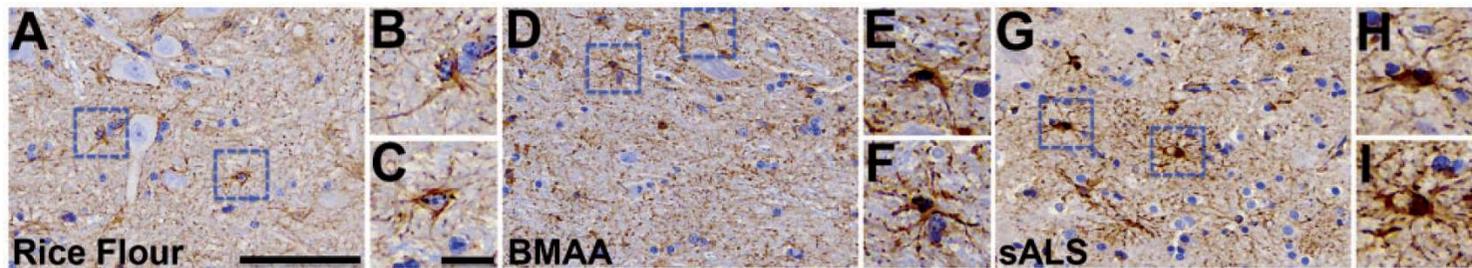


a, b, c, d : singes

e, f : humain

L-Serine Reduces Spinal Cord Pathology in a Vervet Model of Preclinical ALS/MND

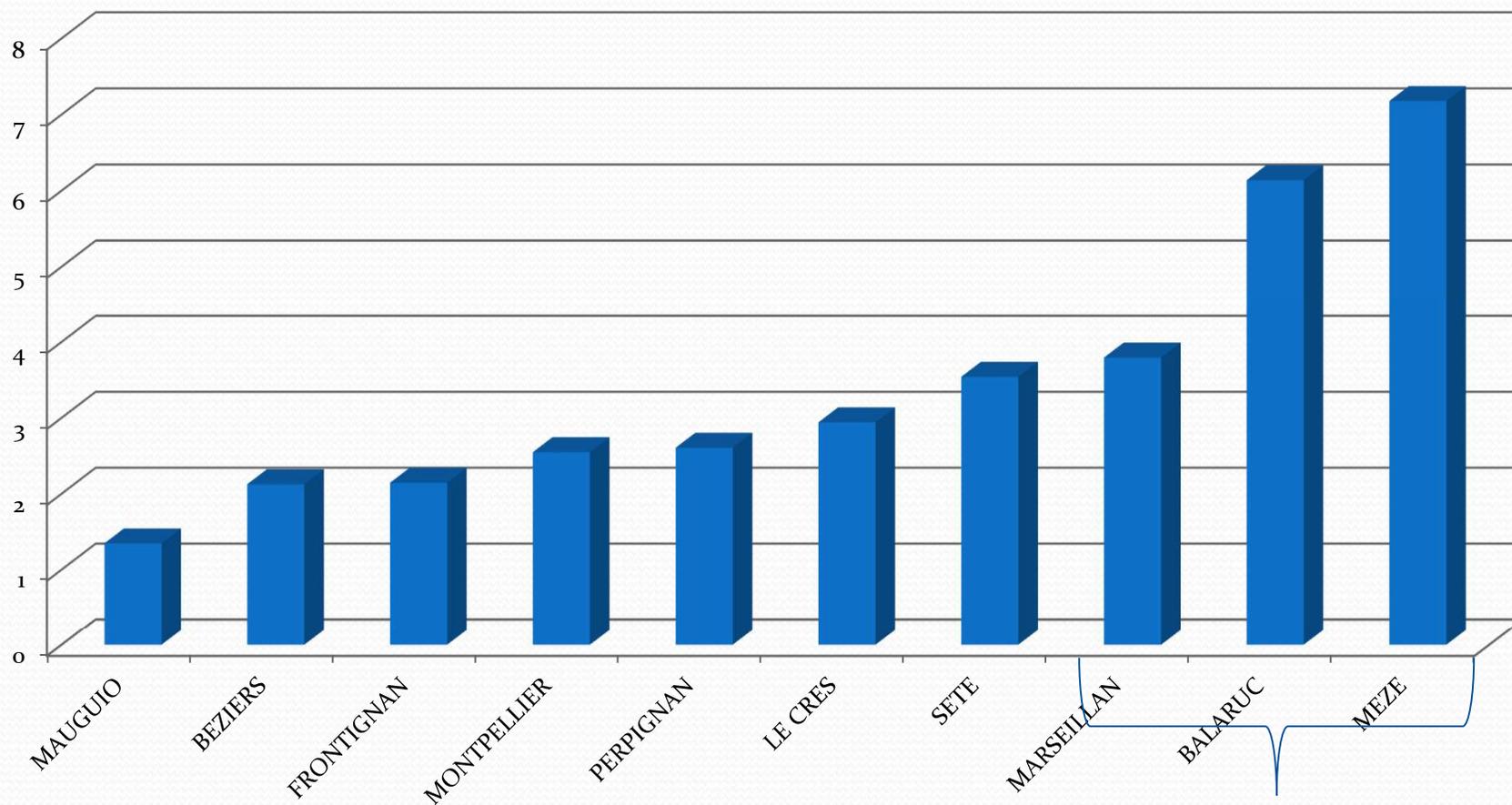
David A. **Davis** , PhD, Paul Alan **Cox** , PhD, Sandra Anne **Banack** , PhD, Patricia D. **Leucasy**,
Susanna P. **Garamszegi**, BSc, Matthew J. **Hagan**, BSc, James T. **Powell**, MSc,
James S. **Metcalf** , PhD, Roberta M. **Palmour** , PhD, Amy **Beierschmitt** , DVM,
Walter G. **Bradley** , DM, and Deborah C. **Mash**, PhD



A Montpellier

- Nombreux cas de SLA sur Mèze, ainsi que d'autres maladies neurodégénératives
- Première hypothèse : génétique
 - Généalogie des patients : pas de lien
 - Etude génétique : pas de mutation
- Deuxième hypothèse : environnement
 - Mèze : la plus importante zone de production d'huitres et de moules en France, dans la lagune de Thau
- Plan :
 - Confirmer la sur incidence à Mèze
 - Rechercher de la BMAA dans les huitres et les moules
 - Elargir la recherche en développant un réseau

Cas de SLA /100 000, entre 1994 and 2009



Bassin de Thau

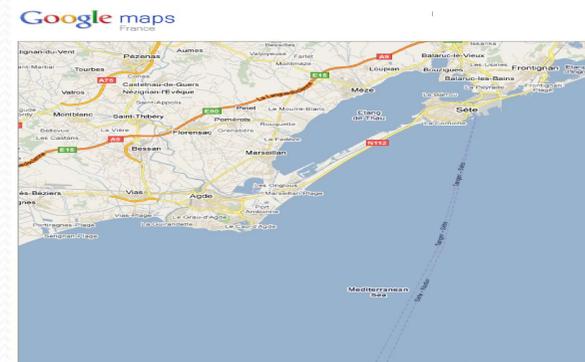
First step: identify ALS cases

- Period : 1994 – 2009
- 997 ALS cases registered in our hospital
 - 380 in Hérault district

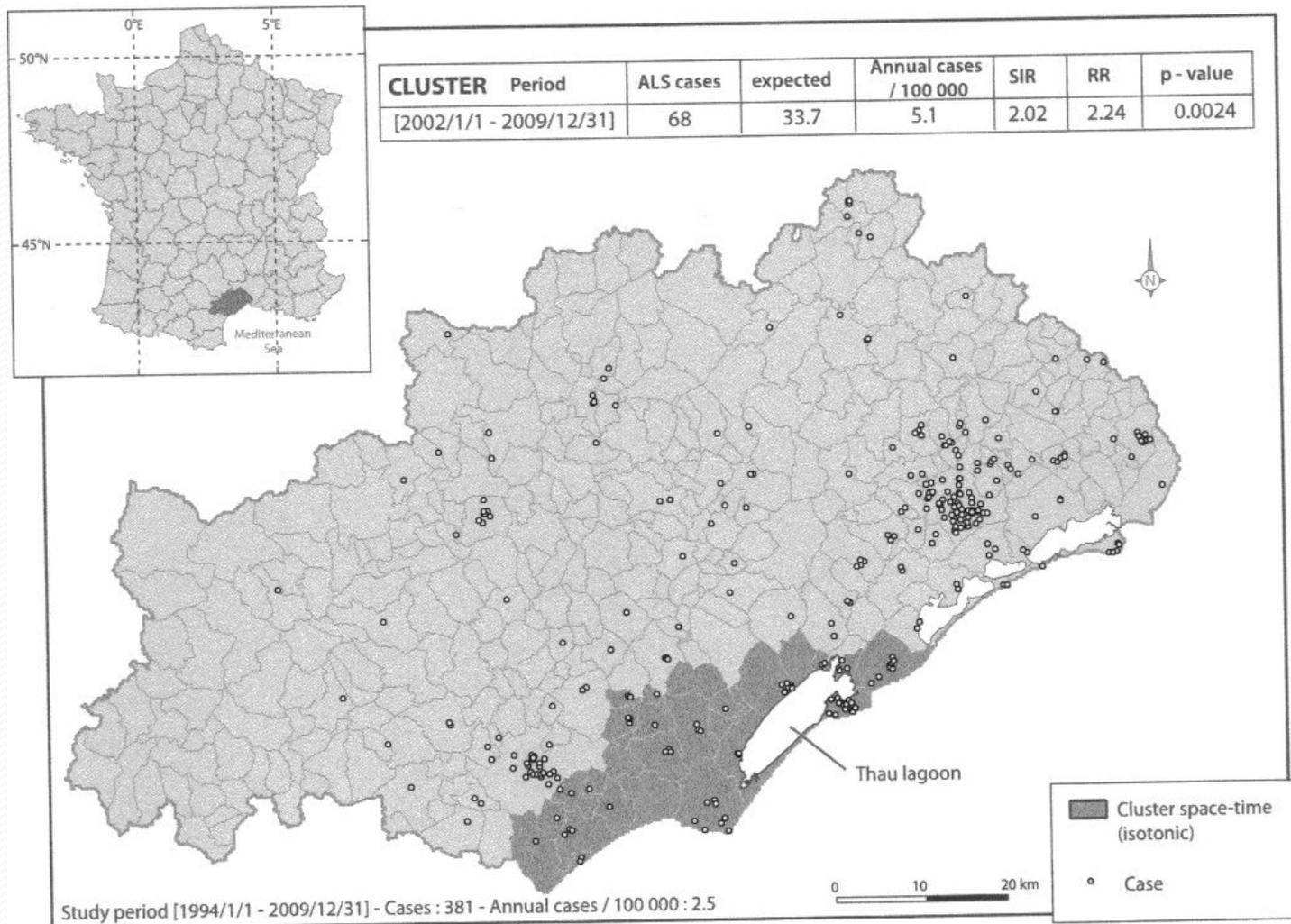


Thau particularities

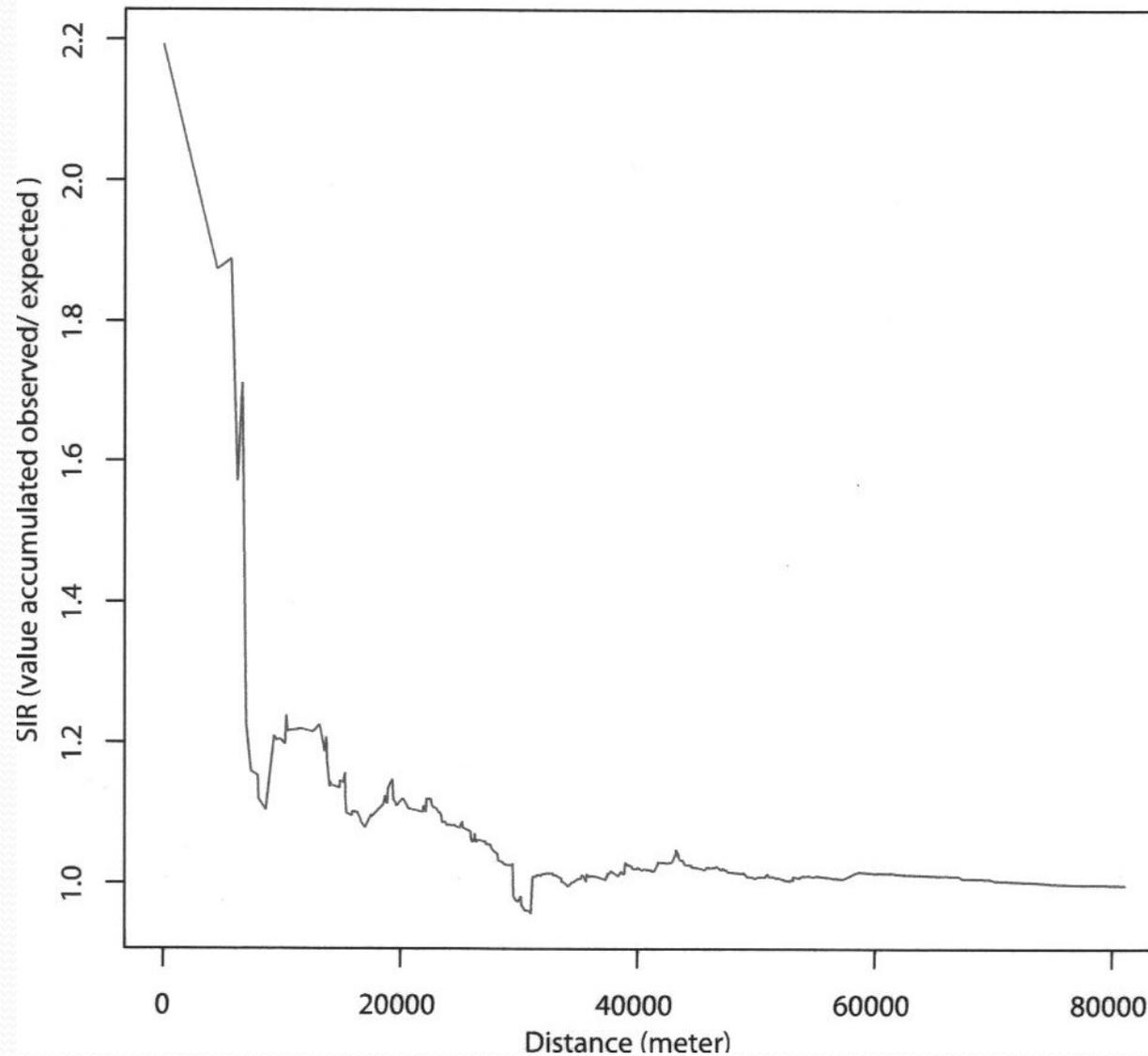
- Inhabitants from Mèze and Bouzigues are consuming oysters and mussels every day all year long
- Much higher amount than anyone else
- No cluster in Sète:
 - Feeding habits are different
 - Sète is a huge harbour
 - People is mainly consuming fishes, not shells



Recherche d'une agrégation géographique comprenant un nombre significatif de cas

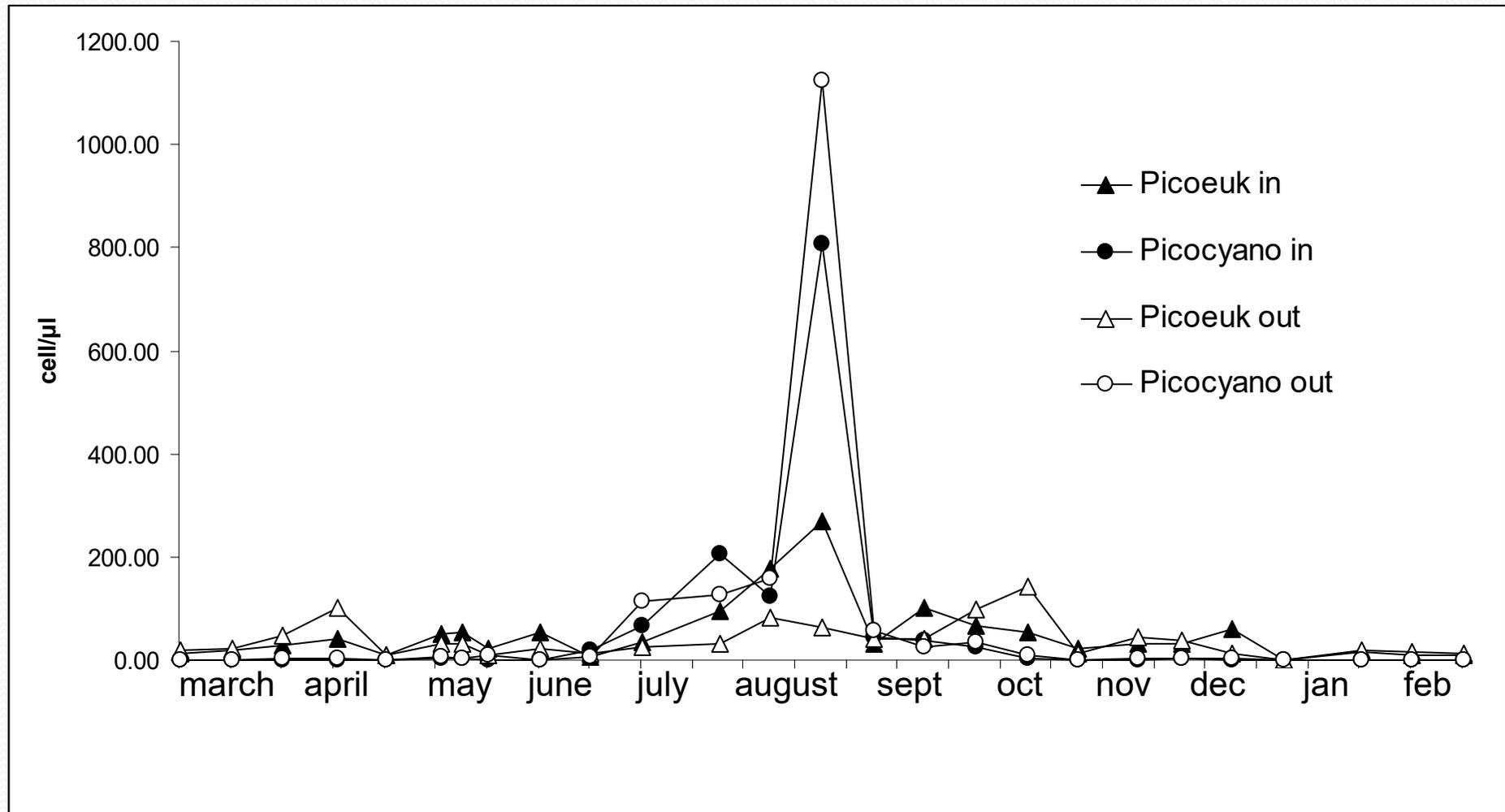


Au plus on s'éloigne de Mèze au plus la significativité statistique diminue





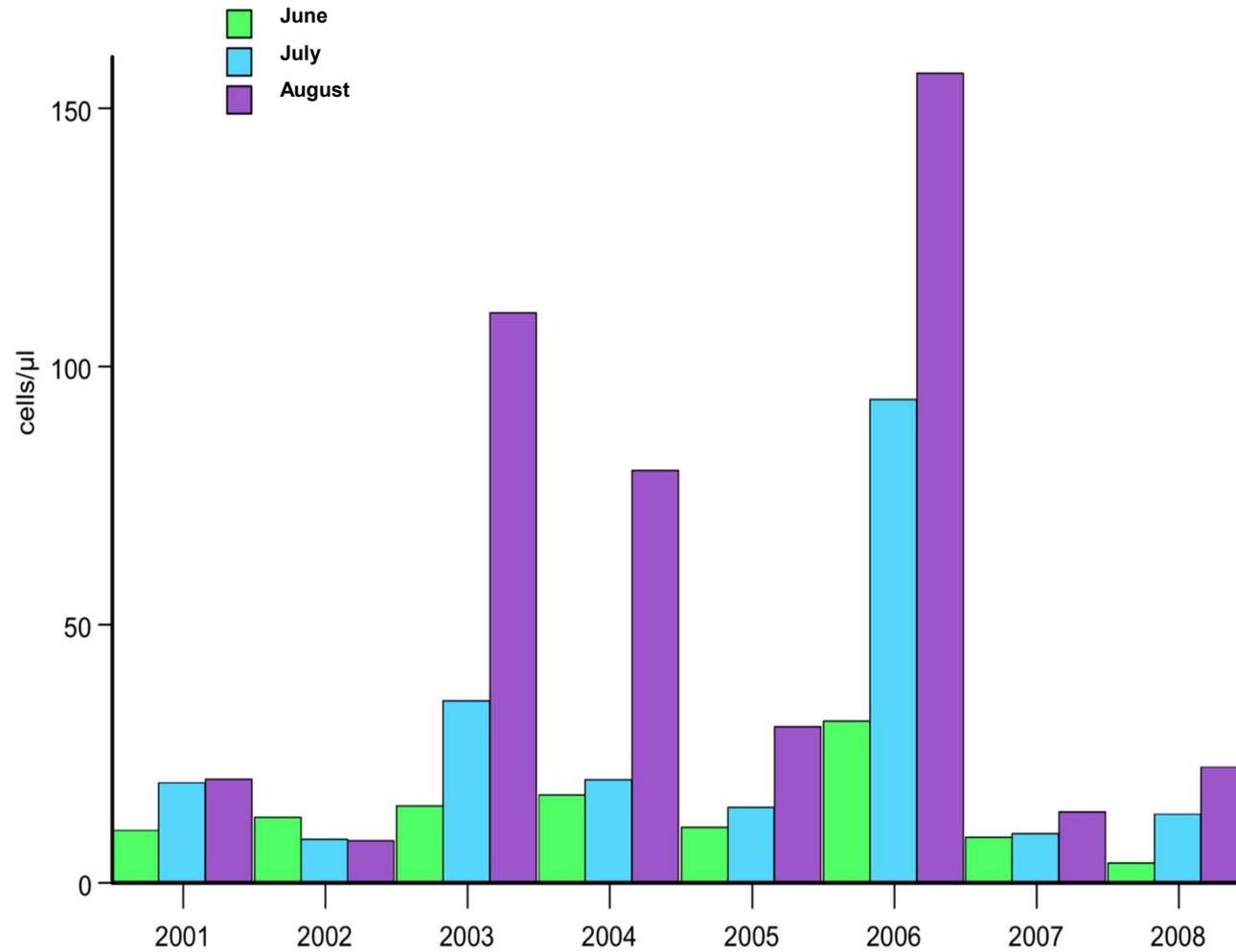
Seasonal variations of the picophytoplankton : 2009



Masseret et al., 2013



Picocyanobacteria in the Thau lagoon : temporal variations



BMAA in oysters and mussels, Masseret et al., 2013

BMAA

(Masseret et al., 2013)

↗ Oyster (0,6-1,6 $\mu\text{g/g}$)

↘ Mussels (1,8-6 $\mu\text{g/g}$)

BMAA in oysters and mussels, D Reveillon et al., 2014



BMAA ($\mu\text{g/g}$) :	3,8 – 14,3	2,6 – 10,3
DAB ($\mu\text{g/g}$) :	3,4 – 9,7	3,3 – 8,8
AEF ($\mu\text{g/g}$) :	0,6 – 1,4	0,6 – 1,7

Masseret et al.

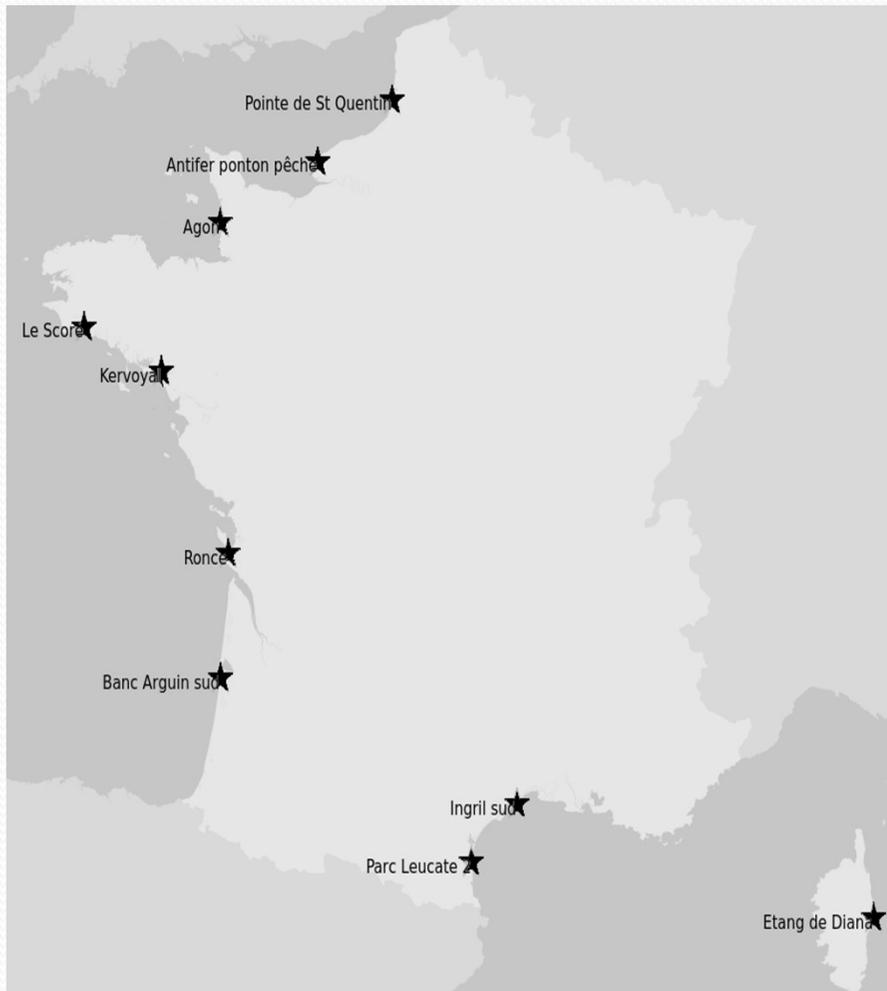
Mussels: 1995 - 2008

Oysters: apr-aug 2009

Réveillon et al.

Mussels and oysters from
jun to sept 2009

BMAA in molluscs from all other areas of production (Réveillon et al., 2015)



Molluscs collected gracious to the REPHY network

- Survey of emerging toxins

10 areas: 1 sample collected/month

- Total of 97 samples (GD) on 9 sites

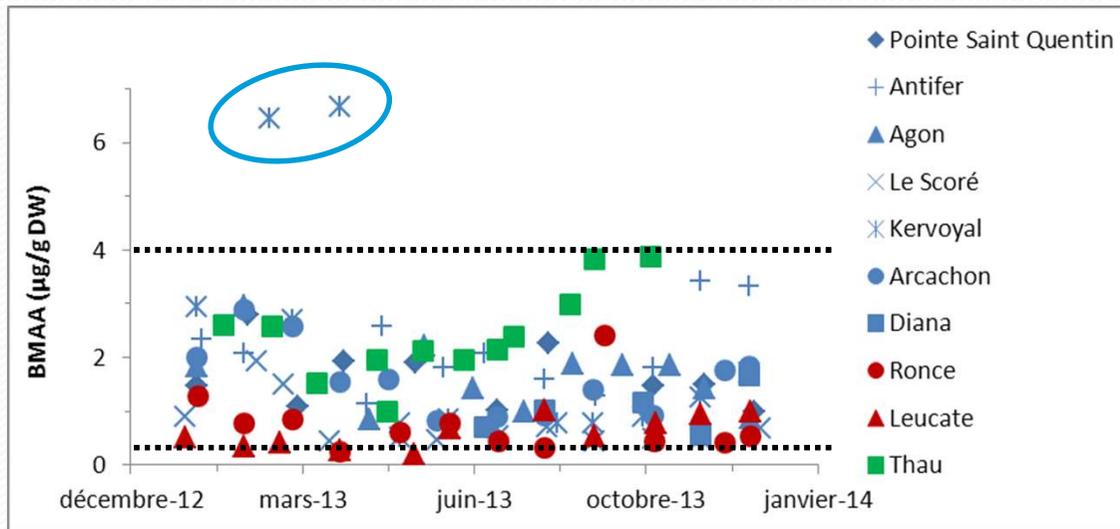
Analysis of BMAA and isomers

- Only total value (free and bound)

Relation with phytoplankton

- Link BMAA/microalgae ?

Results



mussels $\approx 0.5 - 4 \mu\text{g/g}$

Thau $\approx 1 - 4 \mu\text{g/g}$

oysters $\approx 0.2 - 1 \mu\text{g/g}$

BMAA concentrations between 0.5 to 4 $\mu\text{g/g}$

Highest concentrations in Thau

Few variations except in Thau (hottest area)

BMAA is present in all the areas

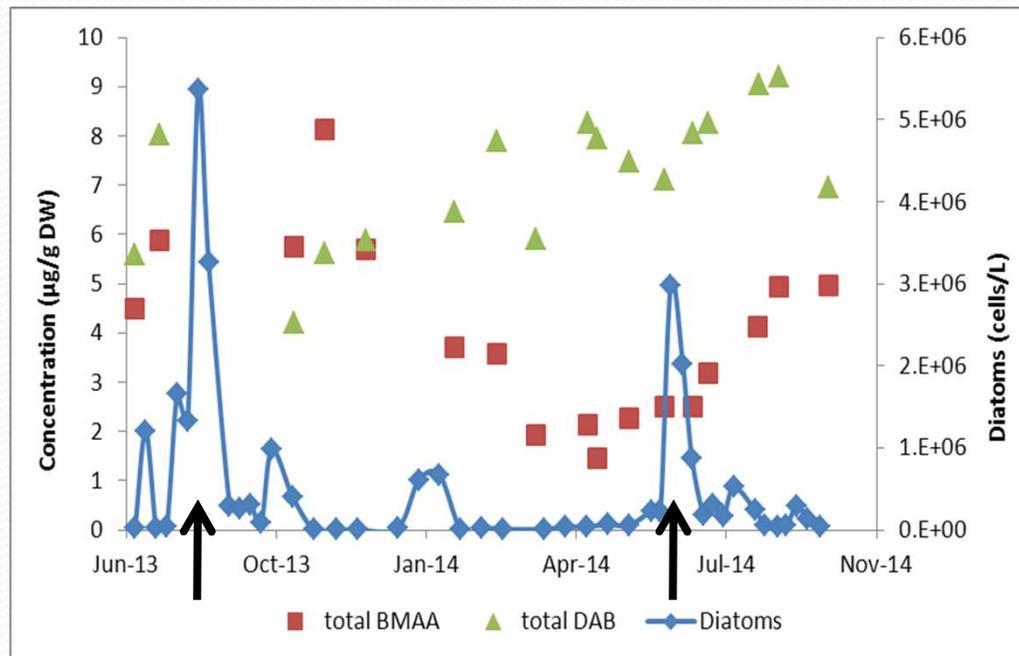
No apparent link with the presence of microalgae BUT feeding habits of molluscs outside Thau are largely unknown

Results

Diatoms (*Chaetoceros* spp) do contain BMAA

They are known to support mussels and oysters growth in Thau (Pernet et al., 2012)

Different dynamics between BMAA and DAB



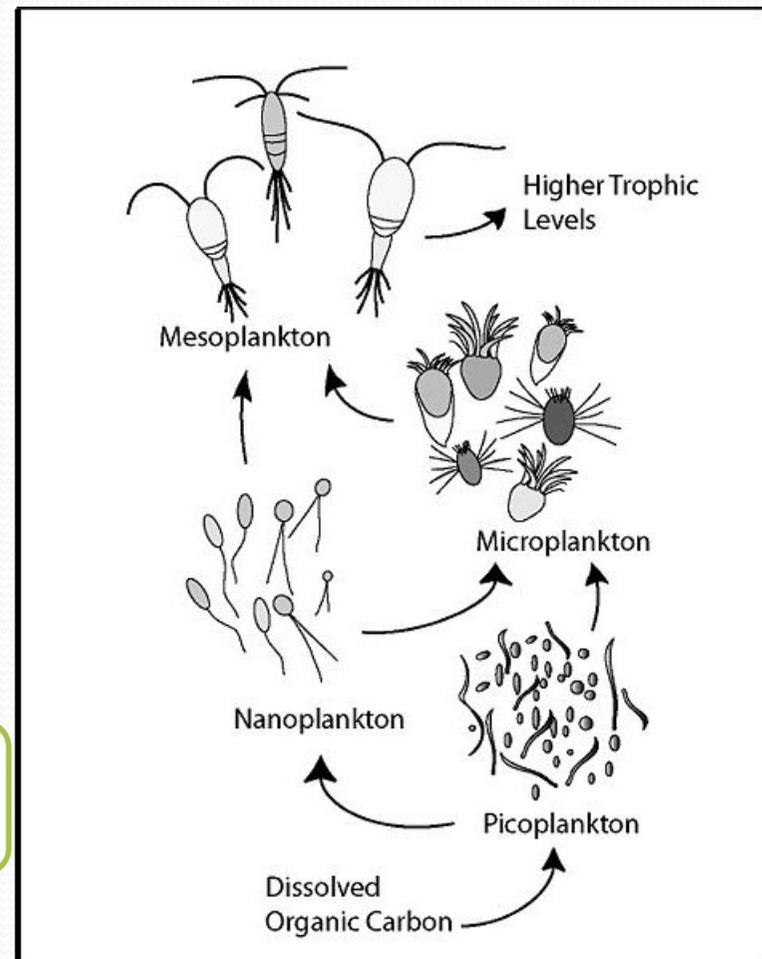
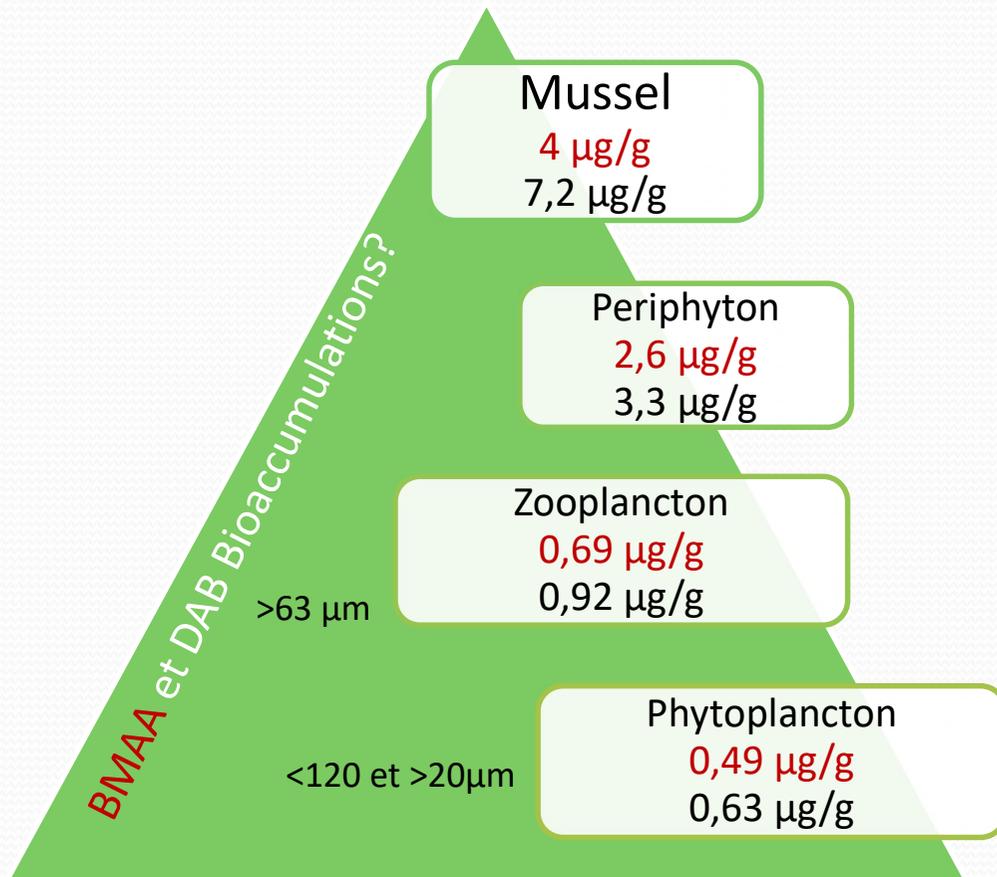
DAB concentration is constant

Accumulation of BMAA after blooms of diatoms

« clearance » of BMAA inbetween

Increased concentrations of BMAA and DAB all along the feeding chain

Phytoplankton (diatoms) is the base of this chain



BMMAA/ALS/Thau

- BMMAA is produced by diatoms and thus found in mussels and oysters
 - In all areas in France
 - But more markedly in Thau
- Climatic variations (temperature) may explain variations of BMMAA concentrations : during summer, periods of blooms (cyanos and diatoms)
- Mussels and oysters consumption
 - In the general population stops during summer
 - But not for the people living around Thau

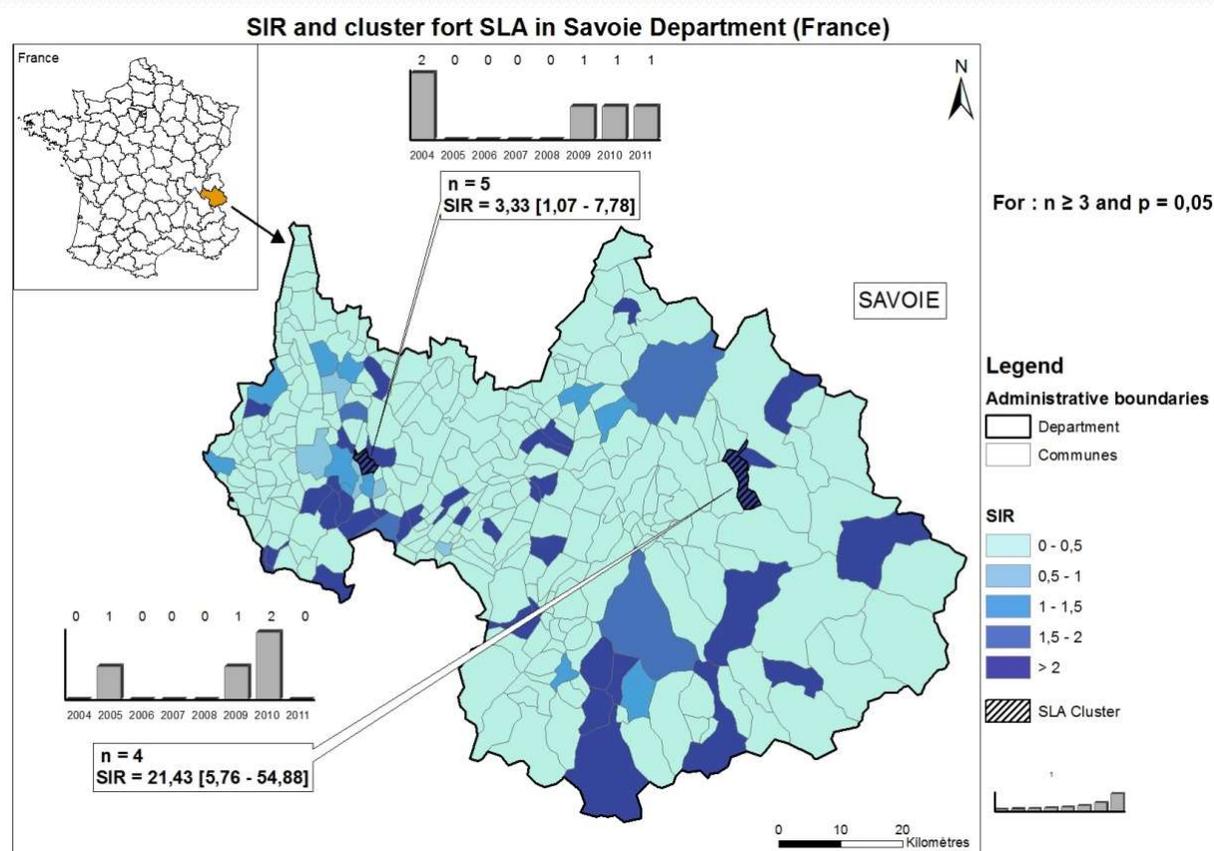
Bioaerosols in the thau area

- ALS patients from Mèze have a daily intense physical activities
 - Facilitate entry of the toxin due to the higher metabolism of the motoneurons ?
- Sport practice, jogging, surf etc...
- Blooms of cyanobacteria are at the surface
- Diatoms : mainly navicular, do contain BMAA
- Wind is frequent and strong in the area
 - May expose to aerosolisation of toxin/cyano/diatoms
 - Surfers like wind...

Cluster ayant justifié une alerte sanitaire auprès CIRE / ARS (automne 2013)

Le cas Bellentre

A ce jour 12 cas sur 200 habitants en 2013



Nombre de cas

- Entre 1991 et 2013 :
 - 5 cas dans le hameau
 - Dont 2 conjoints
 - Tous y vivaient depuis leur naissance ou leur petite enfance
 - Tous voisins
 - Sur une population régulière locale de 200
 - SIR = 45 ($p < 0.00001$)

Nombre de cas bis

- Entre 2010 et 2015
 - 7 autres cas
 - Sujets non originaires du hameau mais qui y passaient entre 10 et 50 % de leur temps depuis des années
 - Pas de calcul de SIR possible dans ces 7 cas

Expositions

- 11/12 : sport intensif
- 8 : ont un jardin potager, alimenté avec l'eau du bas des pistes, issue de canons à neige (risque sanitaire reconnu par l'ANSES)
- 6 : mangeaient les champignons locaux
- 5 étaient prof de ski
- 4 tenaient un restaurant

Conclusions

- Aucune
- Il est important d'observer et de décrire
- Expositions communes
 - HAP
 - Sport
 - Aliments
 - Métaux lourds ?
 - Contact humains ???
- BMAA et autres à doser dans les cerveaux
- ET....

Depuis cette description en 2016

- 13^{ème} cas
 - Premier adjoint au maire
 - Décédé de SLA il y a 2 ans
- 14^{ème} cas
 - Sportif village voisin, 36a
- 15^{ème} cas
 - Dans le village
- Reprise interrogatoires et visite avec neurotoxicologue, Pr Spencer, Portland, qui a décrit la BMAA

Les champignons...

- Enquête de P Spencer
 - Spencer pensait que les fausses morilles pouvaient être responsables : gyromitres.
 - Contient de l'hydrazine qui se transforme en produit cancérigène et neurotoxique mais champignon connu comme toxique...et interdit à la vente
 - Mais pas là bas !!!!
 - Tous les patients en mangeaient sans les faire cuire de façon adaptée
- Etude franco américaine en cours pour identifier les toxines et tester leur toxicité

Conclusion

- Prouver le rôle d'un facteur environnemental dans la genèse d'une maladie est difficile
- Les expositions peuvent être
 - Multiples
 - Anciennes (plus de 20 ans pour le prion)
- Dans la SLA, peu de consensus
- La littérature permet de retenir au moins un rôle pour :
 - Pesticides
 - Métaux lourds
 - Fumées et polluants
 - Exercice physique +++ (plus de 75% des malades)
 - BMAA
- Les liens de causalité sont-ils directs ou non ?
 - À ce jour ils ne sont pas prouvés malgré de nombreux travaux



Montpellier

Sébastien Alphandéry
Laura Labar
Raul Juntas-Morales
Nicolas Pageot
Florence Esselin



Eric Abadie
Zouher Amzil
Damien Réveillon



Grenoble

Vincent Bonneterre
Emmeline Lagrange



Sandra Banack
Paul Cox
James Metcalf



Estelle Masseret
André Vaquer



Farid Boumédiène
Philippe Couratier
Benoit Marin
Pierre-Marie Preux



Luc Brient