

RAPPORT FINAL

Biotoxines marines et santé publique – Interactions avec les systèmes membranaires et élucidation de leurs mécanismes d’action aux niveaux cellulaires et moléculaires

Philipp Hess, Laboratoire Phycotoxines, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) et Institut Universitaire Mer et Littoral (FR 3473 CNRS / Université de Nantes / Ifremer), 44 000 Nantes, France.

Jean-Louis Schwartz, Département de physiologie, Faculté de médecine et Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM-FRSQ), Université de Montréal, Montréal (Québec), et Centre SÈVE (FQRNT), Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) Canada.

Les biotoxines marines sont généralement produites par les micro-algues qui peuvent s'accumuler dans les coquillages comestibles. Ces phycotoxines, dangereuses pour la consommation humaine de coquillages, constituent un problème majeur au niveau de la santé publique, tant en France qu'au Canada. Bien que les symptômes soient bien connus pour la plupart des toxines marines, leur mécanisme d'action à l'échelle moléculaire et au niveau cellulaire n'est toujours pas élucidé (Rossini and Hess, 2010).

Dans ce projet financé en partie par le FFCR de juillet 2011 à août 2013, on s'est concentré sur deux phycotoxines, la pinnatoxine G (PnTX-G) produite par *Vulcanodinium rugosum* (Nézan and Chomérat, 2011) et l'azaspiracide (AZA) produit par *Azadinium spinosum* (Satake et al., 1998; Tillmann et al., 2009). Le laboratoire français (Ifremer, Nantes) s'est chargé de l'isolation et de la purification des toxines à partir de biomasse algale ou de coquillages, ainsi qu'à l'étude de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, impact d'agents solubilisants, etc.). Les études fonctionnelles (capacité des toxines à former

des pores, effets intracellulaires) ont été réalisées au laboratoire canadien (Université de Montréal) au moyen de techniques optiques (dispersion lumineuse et microspectrofluoroscopie).

Cette collaboration entre la France et le Canada était entièrement nouvelle. Elle a permis d'explorer des pistes inédites et indispensables à la compréhension de la pharmacocinétique et des mécanismes d'absorption et d'intoxication des phycotoxines dans le corps humain, tant au niveau des mécanismes de reconnaissance des cibles cellulaires qu'à celui des mécanismes moléculaires et cellulaires d'intoxication (perméabilisation *in vitro*, perméabilisation des membranes plasmiques ou intracellulaires, altération de la signalisation intracellulaire). Les résultats obtenus grâce à cette collaboration France-Canada auraient été impossibles à atteindre par chacun des laboratoires pris séparément, dont l'un excelle dans les techniques analytiques et celles de purification préparative des phycotoxines, alors que l'autre est un chef de file dans le domaine des techniques d'analyse fonctionnelle des toxines bactériennes et végétales, en particulier de celles qui agissent au niveau des membranes et y forment des pores.

Proposition initiale

Le travail proposé dans la demande d'appui financier portait sur l'étude de la yessotoxine, généralement produite par *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera*, et de l'AZA. Il visait à tester les hypothèses suivantes :

- 1) les toxines sont reconnues à la surface apicale de l'épithélium intestinal des organismes cibles ;
- 2) les toxines s'ancrent à la membrane plasmique soit directement dans le feuillet phospholipidique soit via des protéines de surface (protéines endogènes jouant le rôle de "récepteurs") ;
- 3) les toxines perméabilisent la membrane plasmique des cellules épithéliales de l'intestin.

On s'était par conséquent donné pour objectifs :

- 1) la caractérisation des mécanismes de liaison ou d'insertion (ou les deux) des toxines à la membrane apicale d'un modèle expérimental de l'intestin de mammifère ;
- 2) l'élucidation des mécanismes de perméabilisation structurée de la membrane épithéliale ou de la destruction de son intégrité membranaire par les toxines, dans diverses conditions expérimentales (composition des membranes et des milieux, force ionique, pH).

Pour ce faire, une stratégie expérimentale avait été choisie qui reposait sur l'utilisation, dans diverses expériences de biophysique membranaire (spectroscopie et microfluorospectroscopie), de vésicules ou de fragments de membranes à bordure en brosse (VMBB ou FMBB) obtenues à partir de l'intestin de souris.

Changement apporté au projet soumis

Entre le dépôt de la demande le 31 janvier 2011 et l'obtention de l'appui financier du FFCR le 27 juin de la même année, il avait été observé qu'une nouvelle classe de toxines produites par *V. rugosum* présentait un intérêt particulier. En effet, une famille de ces toxines, les pinnatoxines (PnTX, ~694 Da), habituellement considérées comme des toxines à effets rapides en raison de leur forte toxicité sur la souris, tant par voie intra-péritonéale que par voie orale (Hess et al., 2013; Munday et al., 2012; Selwood et al., 2010), ne semblaient pas être responsables d'intoxications humaines. L'observation de toxicités relativement semblables par des voies d'absorption différentes distingue cependant les PnTX des autres toxines du groupe des imines cycliques. Il semblerait que les mécanismes de détoxification par l'intestin et le foie les affectent moins et qu'elles sont en mesure de traverser la barrière épithéliale de l'intestin, ce qui justifie un nouvel effort au niveau de la compréhension de leur mécanisme d'action et de leur biodisponibilité, ainsi qu'une surveillance accrue des coquillages destinés à la consommation humaine.

Les effets observés lors du bioessai murin des PnTX-E, F et G sont d'ordre neurologique et les cibles de ces toxines semblent se situer au niveau des récepteurs nicotiques des jonctions neuromusculaires (Hellyer et al., 2011, 2013; Hess et al., 2013; Munday et al., 2012; Selwood et al., 2010). Il a cependant été rapporté antérieurement que les PnTX-A, B et C affectent les canaux calciques (Kuramoto et al., 1999). La PnTX-G, initialement découverte dans des organismes d'Australie, de Nouvelle-Zélande et du Japon, a été retrouvée en Europe (Hess et al., 2013; Rundberget et al., 2011) et au Canada (McCarron et al., 2012). De plus, alors que des extraits bruts de *V. rugosum* étaient cytotoxiques sur les cellules Neuro2A (neuroblastes du cerveau de souris) et KB (carcinome cervical humain) et perturbaient le cycle cellulaire des cellules Caco-2 (adénocarcinome colorectal humain), la PnTX-G purifiée à partir d'extraits bruts de *V. rugosum* était pratiquement sans effet sur les cellules ci-dessus (Geiger et al., 2013). La portimine, une autre toxine récemment identifiée dans des extraits bruts de *V. rugosum*, pouvait donc être impliquée dans l'activité de ces derniers; cette imine cyclique est d'ailleurs toxiques pour les cellules Vero (fibroblastes du rein de singe) et P388 (lymphoblastoïdes de souris) via un mécanisme d'apoptose (Selwood et al., 2013).

Il devenait donc important, dans le cadre de ce projet, de se pencher sur le mécanisme d'intoxication cellulaire de *V. rugosum*, ceci dans le contexte particulièrement pertinent pour un projet FFCR de la présence, d'une part, de ces toxines en France et au Canada, et du besoin, d'autre part, d'en évaluer le risque pour la population (Alexander et al., 2010). Il a donc été décidé de rediriger une partie de nos efforts de recherche sur les produits de ce dinoflagellé, sans pour autant abandonner les études

proposées pour l'AZA de *A. spinosum*. Malgré cette réorientation du projet, les hypothèses de travail, les objectifs généraux et la stratégie expérimentale de la recherche demeuraient généralement inchangés.

Rapport d'activité scientifique et bilan global

1) Activités scientifiques

La purification et la préparation des toxines AZA et des fractions d'extraits de *V. rugosum* furent effectuées à l'Ifremer de Nantes qui a aussi fourni les échantillons purifiés de PnTX-G obtenus de M. Quilliam, Conseil national de recherches Canada (*voir Annexe 1* (Hess et al., 2012)). Les échantillons ainsi que leurs véhicules furent ensuite placés sous ampoules ambrées scellées et expédiés à l'Université de Montréal où furent réalisés les divers tests fonctionnels.

Dès le début des travaux, on s'est rapidement rendu compte que le modèle expérimental proposé initialement (VMBB ou FMBB de l'intestin de souris) présentait des difficultés qui risquaient, compte tenu de l'échéancier et des ressources limitées de main d'œuvre, de ralentir considérablement l'avancement des travaux. En effet, l'accessibilité à une source fiable de souris dans l'édifice où la recherche devait se faire à l'Université de Montréal n'était plus possible et l'alternative, soit l'utilisation de rats, n'avait pas permis de produire en quantité suffisante des VMBB ou des FMBB de haute qualité, c'est-à-dire osmotiquement étanches, qui sont absolument nécessaires à l'utilisation efficace de nos techniques de mesure du gonflement osmotique par spectroscopie de dispersion lumineuse. Plutôt que de consacrer une partie importante de nos efforts et de notre temps à résoudre les problèmes techniques reliés à la préparation de tissu épithélial d'intestins de souris ou de rats, nous nous sommes tournés vers la mise en culture et l'utilisation de lignées de cellules Caco-2, de cellules HepG2 (carcinome de foie humain) et, plus récemment, en raison de la forte variabilité des réponses observées avec les Caco-2, de cellules T84 (adénocarcinome de côlon humain).

L'effet des toxines sur les cellules en culture fut donc évalué grâce à la technique de microspectrofluorométrie utilisant le Fura-2, une sonde ratiométrique intracellulaire, dont le rapport de fluorescence émise à 510 nm en réponse à l'excitation rapidement alternée, toutes les 500 ms, entre deux longueurs d'onde (350 nm et 380 nm), est directement relié à la concentration de calcium libre dans les cellules. Ces mesures peuvent être faites, grâce à un cadrage du faisceau lumineux émis par un diaphragme ajustable, sur une seule cellule ou, au besoin, sur des petits îlots de trois à cinq cellules observées à fort grossissement (400x) au moyen d'un spectrofluoromicroscope inversé. Les cellules furent placées dans une chambre de perfusion permettant l'ajout de matériel à tester et le remplacement de divers milieux qui baignent les cellules. La cinétique des variations de concentration

calcique, dans une cellule individuelle, résultant de l'exposition aux toxines dans différentes conditions expérimentales, pouvait donc être suivie avec une excellente résolution temporelle et spatiale.

Les changements de concentration de calcium cytoplasmique observés suite à l'exposition des cellules aux toxines peuvent être dus à une perméabilisation des membranes plasmiques par les toxines (formation de pores), à la modulation de transporteurs membranaires de calcium par les toxines, ou à une signalisation calcique intracellulaire déclenchée par les toxines agissant sur des protéines membranaires ou dans la cellule. Si les effets observés sont rapides, les phénomènes d'apoptose et les effets géniques peuvent être écartés, mais il n'est pas exclu que les phénomènes de perméabilisation et de signalisation puissent éventuellement, à plus long terme, avoir des conséquences au niveau génique ou provoquer la mort cellulaire.

Les deux types de toxines (toxines de *A. spinosum* et de *V. rugosum*) ont été testés en termes de leur effet sur la concentration de calcium intracellulaire de trois lignées cellulaires (HepG2, Caco-2 et T84). Dans le cas d'*A. spinosum*, on a utilisé d'une part un extrait brut (« AZA brute ») comprenant de l'AZA1 en grande majorité, un peu d'AZA2 et une très faible quantité d'AZA716 (moins de 5%) et d'autre part, de l'AZA1 purifiée. Pour *V. rugosum*, les expériences ont été réalisées avec de l'extrait brut (« PnTX-G brute »), avec de l'extrait semi-purifié (« PnTX-G semi-purifiée », la fraction 3 contenant surtout de la PnTX-G (Geiger et al., 2013) mais aussi de la portimine tel que démontré récemment (Selwood et al., 2013)) et avec de la PnTX-G purifiée (Hess et al., 2012).

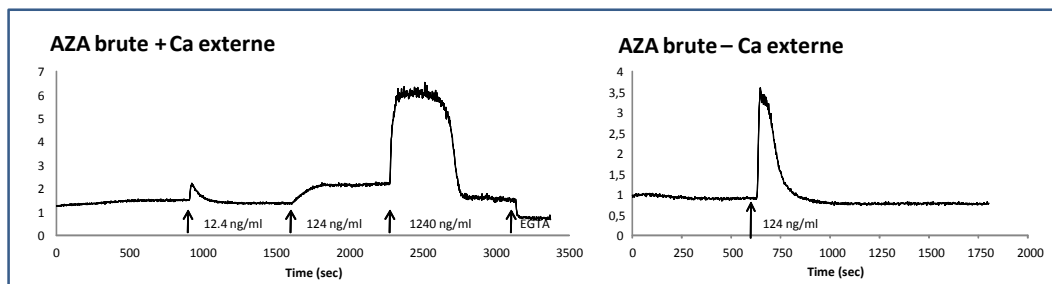
Les principaux résultats des expériences préliminaires effectuées sur les cellules HepG2, dans le cadre de ce projet FFCR, sont résumés ci-dessous et illustrés dans les figures 1 et 2. Les résultats des travaux sur les cellules Caco-2 et T84 sont en cours d'analyse. Ils ressemblent à ceux obtenus avec les HepG2.

AZA brute – Les réponses calciques (modification de la concentration cytosolique de calcium) des cellules HepG2 à l'AZA brute, en présence de calcium externe, dépendent de la dose utilisée (Figure 1A) : à faible dose, la réponse calcique est transitoire ; elle est soutenue, mais d'amplitude relativement faible, à dose plus élevée ; à plus forte dose, on observe une réponse ressemblant à celle obtenue avec un ionophore au calcium comme l'ionomycine. En l'absence de calcium externe, la concentration de calcium cytosolique augmente de façon transitoire. On peut donc conclure que l'AZA brute déclenche, d'une part, une réponse cellulaire (à faible dose ou en l'absence de calcium externe), et d'autre part, une réponse soutenue et même lytique (à dose plus élevée et en présence de calcium externe). Le premier type de réponse correspond probablement à une augmentation de calcium cytosolique due à la libération de calcium stocké dans les compartiments intracellulaires (réticulum endoplasmique) en

réponse à une stimulation extracellulaire par l'AZA brute ; cette réponse pourrait être impliquée dans un mécanisme de défense cellulaire contre l'agression intoxicante. Dans le deuxième cas, le calcium externe semblerait entrer dans la cellule via un ou plusieurs mécanismes de transport transmembranaire (formations de pores ioniques par la toxine, activation de transporteurs, désorganisation de la membrane phospholipidique de la cellule), mécanismes qui restent à caractériser.

AZA1 purifiée – Cette préparation déclenche le même genre de réponses (transitoires ou soutenues, en présence de calcium externe ; transitoires, en l'absence de calcium externe) que l'AZA brute, mais à des doses plus élevées (Figure 1B). Compte tenu du fait que l'AZA brute contient environ 80% d'AZA1, 15 à 18% d'AZA2 et moins de 5% d'AZA716, il semblerait que ces deux dernières toxines jouent un rôle non négligeable – peut-être synergique -- dans la réponse calcique globale des cellules HepG2 exposées à l'AZA brute.

A.



B.

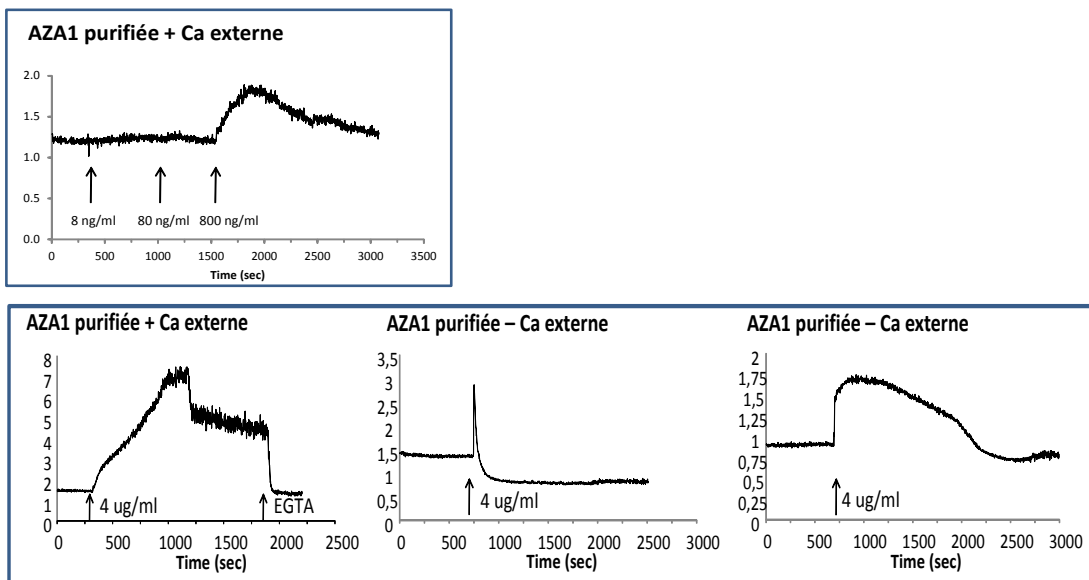


Figure 1. Effets des extraits bruts (AZA1 (~82%) et AZA2 (~18%)) (A) et de AZA1 purifiée (B) de *A. spinosum* sur le calcium intracellulaire des cellules isolées HepG2.

PnTX-G brute – Les réponses calciques des cellules HepG2 exposées à la préparation de PnTX-G brute (Figure 2A) ont un déroulement cinétique biphasique, très différent de ce qui a été observé avec les toxines AZA. Les deux phases sont bien séparées aux plus faibles doses de toxine et l'amplitude de la seconde est très supérieure à celle de la première, de l'ordre de ce qu'on observerait avec de l'ionomycine. A dose plus élevée, la réponse est plus rapide. En l'absence de calcium externe, une petite réponse est détectée, biphasique elle aussi. Ces réponses suggèrent à nouveau un mécanisme d'élévation du calcium intracellulaire en deux temps : une « réaction » de la cellule à la détection de toxine du côté externe de la membrane plasmique, suivie d'une entrée massive de calcium externe via des canaux ou transporteurs endogènes ou des pores formés par la toxine.

PnTX-G semi-purifiée – Les réponses calciques des HepG2 à la PnTX-G semi-purifiée (la fraction 3, la plus riche en PnTX-G, du processus de purification de l'extrait brut de *V. rugosum*) sont très similaires à celles de l'extrait brut enregistrées en présence de calcium externe (Figure 2B). Elles en possèdent le déroulement biphasique caractéristique, avec une seconde phase d'amplitude très supérieure à celle de la première phase. Par contre, lorsque les cellules sont baignées dans un milieu physiologique dépourvu de calcium, aucune réponse n'est observée. Il se pourrait donc que la première phase, observée en présence de calcium externe, corresponde à une libération du calcium des compartiments intracellulaires, qui dépendrait de la présence de calcium externe. Cette hypothèse demande à être vérifiée par des expériences faisant appel à des agents pharmacologiques (inhibiteurs, bloqueurs ou stimulateurs) permettant de disséquer les réponses calciques en présence ou absence de calcium extracellulaire.

PnTX-G purifiée – Les expériences réalisées avec la PnTX-G pure obtenue du Conseil national de recherche du Canada ont montré que cette toxine était sans effet sur le calcium intracellulaire des cellules HepG2 (Figure 2C). Ce résultat, de prime abord surprenant, est très intéressant puisqu'il montre que la PnTX-G n'est pas responsable des effets calciques observés avec l'extrait brut de *V. rugosum*, ou une fraction purifiée de cet organisme, hautement enrichie en PnTX-G. Lors des premières observations de cette absence d'effet de la toxine pure, la présence de nakijiquinone dans les extraits bruts ou semi-purifiés avait été proposée (Geiger et al., 2013). Il semble plus probable, suite à la découverte d'une nouvelle toxine dans les extraits de *V. rugosum*, la portimine (Selwood et al., 2013), que cet agent soit responsable des réponses calciques observées lorsque les HepG2 sont exposées aux extraits bruts ou semi-purifiés de *V. rugosum*. La disponibilité future de portimine pure permettra de vérifier cette hypothèse et de caractériser l'effet de cette nouvelle toxine au niveau des mouvements de calcium intracellulaire lors de l'intoxication.

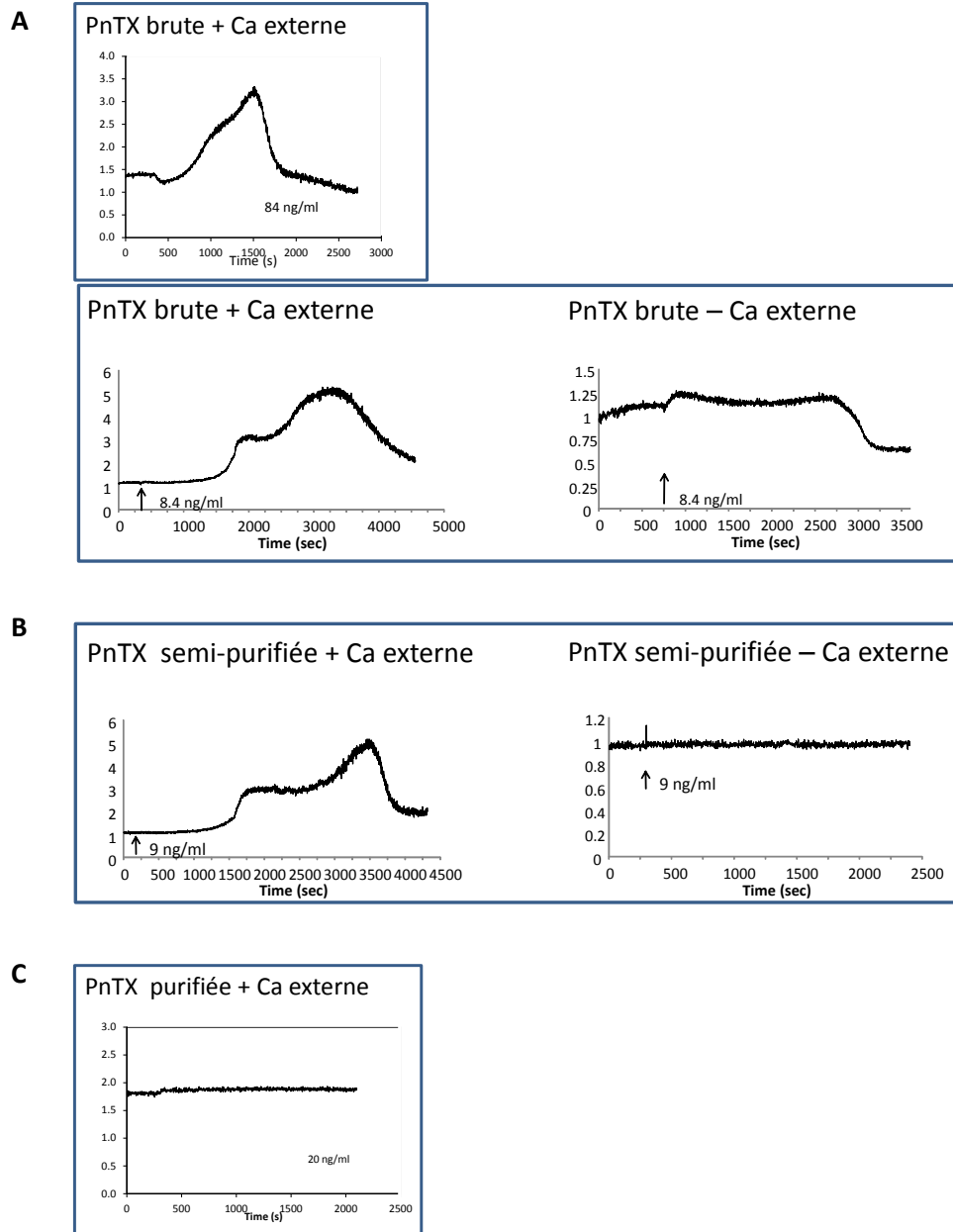


Figure 2. Effets des extraits bruts (A), des extraits semi-purifiés (B) et de la PnTX-G purifiée (C) de *V. rugosum* sur le calcium intracellulaire des cellules isolées HepG2.

2) Formation et personnel hautement qualifié

Le personnel impliqué dans la partie du projet réalisée en France comportait le doctorant Thierry Jauffrais (Ifremer et Université de Nantes), ainsi que Marie Geiger (Ifremer et Université de Nantes), Fabienne Hervé (Ifremer), Thomas Leprêtre (Ifremer) qui ont participé à la préparation, la purification et les tests analytiques des toxines.

Pour les travaux au Canada, les études fonctionnelles ont été faites par Thierry Jauffrais et le personnel de l'Université de Montréal : Vincent Vachon (professionnel de recherche) et Léna Potvin (assistante de recherche), avec l'aide de Julie Verner (technicienne) qui s'est occupée des cultures cellulaires, et celle de Gabriel Narvaez, étudiant à la maîtrise. Vincent Vachon a assuré la formation des jeunes chercheurs (T. Jauffrais, lors de son stage à Montréal, et G. Narvaez) et la coordination du projet au jour le jour. Léna Potvin continue de travailler sur le projet grâce à d'autres sources de financement.

3) Interactions scientifiques entre les partenaires – Voyages et échanges

P. Hess a passé une semaine à Montréal et a participé à de nombreuses discussions avec les membres de l'équipe de J.L. Schwartz ainsi que ceux du Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM – FRSQ) de l'Université de Montréal, groupe de recherche dont J.L. Schwartz est membre.

J.L. Schwartz a rendu visite à trois reprises à l'Ifremer de Nantes dans le cadre des échanges scientifiques entre les partenaires du projet.

T. Jauffrais, comme indiqué plus haut, a effectué un stage intensif d'un mois au laboratoire de J.L. Schwartz à Montréal.

4) Rayonnement international et de transfert de connaissances – Publications et présentations

P. Hess a fait une conférence le 12 juin 2012 à l'Université de Montréal : "Chimiodiversité et mécanismes d'action moléculaires de toxines algales: priorités et perspectives", dans le cadre du cycle de conférences internationales hebdomadaires du GÉPROM.

J.L. Schwartz a fait une conférence à l'Université de Montpellier le 27 juin 2013 : "Intoxications alimentaires et approches fonctionnelles en biophysique et physiologie cellulaire", lors de la 4e Rencontre Montpellier- Sherbrooke sur la sécurité alimentaire.

Un à deux articles scientifiques sont en préparation. Ils porteront sur la modulation du calcium intracellulaire par l'AZA et la PnTX-G et son implication dans les mécanismes d'action de ces phycotoxines.

5) Renforcement et de développement de réseaux internationaux

Des discussions sont en cours entre les partenaires pour la poursuite de la recherche sur les mécanismes d'action des phycotoxines, en particulier de l'AZA, les PnTX et la portimine. Il est question de chercher du financement supplémentaire et d'associer de nouveaux collaborateurs du Canada, de France, des États-Unis et du Japon.

Conclusion et perspectives

Ce petit projet de recherche en collaboration, financé à un niveau somme toute relativement faible (3 000\$/an et par partenaire pendant deux ans), se solde par un excellent succès à plusieurs points de vue :

- a) Il a permis de mettre en place une toute nouvelle collaboration ;
- b) Il a donné accès, pour le laboratoire canadien expert en toxines bactériennes et végétales, à une nouvelle famille de toxines ;
- c) Il a initié le laboratoire français, expert dans la chimie analytique de ces toxines, aux approches d'études fonctionnelles aux niveaux moléculaires et cellulaires ;
- d) Il a résulté en des observations scientifiques originales, en particulier sur la PnTX-G, une toxine peu étudiée ;
- e) Il a également permis de révéler d'autres substances bioactives dans la même microalgue productrice de la PnTX-G (dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*) dont l'étude approfondie s'impose afin de compléter l'évaluation du risque posé par cet organisme ;
- f) Grâce à lui, une formation de pointe a été donnée à plusieurs membres des deux laboratoires ;
- g) Plus généralement, le projet a amélioré notre compréhension des effets des phycotoxines aux niveaux membranaire et cellulaire et a ouvert des pistes d'études supplémentaires pour cribler de manière plus systématique les effets de ces toxines sur les organismes cibles ;
- h) Enfin, ce projet devrait permettre de mettre en place des stratégies nouvelles de détection et d'analyse des phycotoxines pour une meilleure protection de l'écologie marine et du public.

Bibliographie

- Alexander, J., Benford, D., Boobis, A., Ceccatelli, S., Cravedi, J.-P., Domenico, A. D., Doerge, D., Dogliotti, E., Edler, L., Farmer, P., Filipič, M., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., Guerin, T., Knutsen, H. K., Machala, M., Mutti, A., Schlatter, J., Leeuwen, R. v., 2010. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). EFSA Journal. 8, 1628-1667.
- Geiger, M., Desanglois, G., Hogeveen, K., Fessard, V., Leprêtre, T., Mondeguer, F., Guitton, Y., Hervé, F., Séchet, V., Grovel, O., Pouchus, Y.-F., Hess, P., 2013. Cytotoxicity, Fractionation and Dereplication of Extracts of the Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a Producer of Pinnatoxin G. Marine Drugs. 11, 3350-3371.
- Hellyer, S. D., Selwood, A. I., Rhodes, L., Kerr, D. S., 2011. Marine algal pinnatoxins E and F cause neuromuscular block in an in vitro hemidiaphragm preparation. Toxicon. 58, 693-699.

- Hellyer, S. D., Selwood, A. I., Rhodes, L., Kerr, D. S., 2013. Neuromuscular blocking activity of pinnatoxins E, F and G. *Toxicon*. 76, 214-220.
- Hess, P., Abadie, E., Hervé, F., Berteaux, T., Séchet, V., Aráoz, R., Molgó, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C. O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon*. 75, 16-26.
- Hess, P., Hervé, F., Abadie, E., Séchet, V., Molgó, J., Amzil, Z., Fessard, V., 2012. Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*. Ifremer
<http://archimer.ifremer.fr/doc/00094/20518/18190.pdf>. Last accessed: 3/2/2014
- Kuramoto, M., Chou, T., Uemura, D., 1999. Structures and functions of marine bioactive alkaloids. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* 57, 105-115.
- McCarron, P., Rourke, W. A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M. A., 2012. Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1437-1446.
- Munday, R., Selwood, A. I., Rhodes, L., 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon*. 60, 995-999.
- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. *Cryptogam. Algal.* 32, 3-18.
- Rossini, G. P., Hess, P., Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. In: A. Luch, (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Birkhäuser Basel, 2010, pp. 65-122.
- Rundberget, T., Aasen, J. A. B., Selwood, A. I., Miles, C. O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon*. 58, 700-711.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998. Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9967-9968.
- Selwood, A. I., Miles, C. O., Wilkins, A. L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6532-6542.
- Selwood, A. I., Wilkins, A. L., Munday, R., Shi, F., Rhodes, L. L., Holland, P. T., 2013. Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. *Tetrahedron Lett.* 54, 4705-4707.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A., 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *Eur. J. Phycol.* 44, 63-79.