

# THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de LA ROCHELLE**

Spécialité Physiologie animale

Présenté par

**Aurélien CHATELIER**

---

**Modulation des performances cardio-respiratoires du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) par l'apport d'acides gras alimentaires: une étude intégrée des effets cardiaques *in vivo* au courant calcique de type L des myocytes ventriculaires.**

---

Sous la direction du Professeur Patrick BOIS

Encadrement scientifique: Docteur Guy CLAIREAUX et Docteur Nathalie IMBERT

## JURY:

E. FEUNTEUN	Professeur, Université de La Rochelle.	Président
J.L. ZAMBONINO	Docteur, IFREMER, Brest.	Rapporteur
M. CHAHINE	Professeur, Université Laval, Québec (Canada).	Rapporteur
D.J. McKENZIE	Docteur, Danish institute for fisheries research, Danemark.	Examineur
N. IMBERT	Docteur, Université de La Rochelle.	Examineur
P. BOIS	Professeur, Université de Poitiers.	Examineur



# THÈSE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de LA ROCHELLE**

Spécialité Physiologie animale

Présenté par

**Aurélien CHATELIER**

---

**Modulation des performances cardio-respiratoires du bar européen (*Dicentrarchus labrax*) par l'apport d'acides gras alimentaires: une étude intégrée des effets cardiaques *in vivo* au courant calcique de type L des myocytes ventriculaires.**

---

Sous la direction du Professeur Patrick BOIS

Encadrement scientifique: Docteur Guy CLAIREAUX et Docteur Nathalie IMBERT

## JURY:

E. FEUNTEUN	Professeur, Université de La Rochelle.	Président
J.L. ZAMBONINO	Docteur, IFREMER, Brest.	Rapporteur
M. CHAHINE	Professeur, Université Laval, Québec (Canada).	Rapporteur
D.J. McKENZIE	Docteur, Danish institute for fisheries research, Danemark.	Examineur
N. IMBERT	Docteur, Université de La Rochelle.	Examineur
P. BOIS	Professeur, Université de Poitiers.	Examineur

# Remerciements

Je tiens à remercier **Patrick Gentien**, directeur du CREMA (Centre de recherche des Ecosystèmes Marins et Aquacoles), ainsi que le Professeur **Gérard Blanchard**, directeur du LBEM (Laboratoire de Biologie et Environnement Marin), pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires.

La direction de ce travail a été réalisée par le Professeur **Patrick Bois** de l'Université de Poitiers, à qui j'adresse mes plus sincères remerciements. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de cette thèse. Je lui suis également extrêmement reconnaissant pour son soutien, sa disponibilité ainsi que le savoir dont il m'a fait bénéficier au cours de cette thèse mais aussi bien avant par ses enseignements à l'Université de Poitiers et par l'encadrement de mon DEA. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à mes encadrants scientifiques, les Docteurs **Nathalie Imbert**, Maître de conférence de l'Université de La Rochelle, et **Guy Claireaux**, Chargé de recherche CNRS au CREMA. Je leur suis reconnaissant pour leur confiance, leurs nombreux conseils avisés et leur enthousiasme. Je les remercie pour les connaissances dont ils m'ont fait bénéficier sur les poissons et le monde marin. Sans eux, cette thèse n'aurait pas été possible.

Je remercie le Professeur **Mohamed Chahine**, de l'Université Laval à Québec, pour avoir accepté de juger ce travail. Je le remercie également de la confiance qu'il m'a accordée pour un futur projet postdoctoral.

Je remercie le Docteur **José Zambonino**, du centre IFREMER de Brest, pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences pour le choix des alimentations. Je le remercie également pour les discussions enrichissantes que nous avons eues et pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le Professeur **Eric Feunteun**, de l'Université de La Rochelle, de m'avoir accueilli dans son équipe au LBEM et d'avoir accepté de faire parti du jury de ma thèse.

J'adresse un grand merci au Docteur **David McKenzie**, du « Danish institute for fisheries research », pour toute l'aide qu'il m'a apporté pendant ma thèse. Je le remercie pour ses nombreux conseils, pour sa grande disponibilité, sa convivialité et sa générosité tout au long de cette thèse. Merci également d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie beaucoup le Docteur **Romain Guinamard** et le Professeur **Jean François Faivre**, de l'Université de Poitiers, pour les nombreuses discussions et les conseils précieux dont ils m'ont fait bénéficier au cours de cette thèse.

Un grand merci à **Aurélie Prinnet** et au Docteur **Robert Galois**, chargé de recherche CNRS au CREMA, pour leur aide précieuse concernant le dosage des acides gras et la réalisation des statistiques liés à ces dosages.

Merci à **Gaël Guillou** et **Yves Descatoire** pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus en informatique. Que ce soit pour la maintenance, la réalisation de programmes ou la création de mes schémas, ils ont toujours été disponibles et ont toujours réalisé un travail d'une grande qualité.

L'obtention des alimentations utilisées au cours de mes expériences n'aurait pas été possible sans le savoir faire du Docteur **Jean Robin**, du centre IFREMER de Brest, à qui j'adresse mes sincères remerciements.

Un grand merci au personnel technique et administratif du CREMA et du LBEM; **Philippe Pineau, Nicolas Lachaussée, Michel Prineau, Valérie Huet, Bénédicte Charrier, Evelyne Richard, Evelyne Travers, Annick Guilpain, Nicolas Alligner, Armelle Combaud, Anne-lise Monteragioni, Didier Leguay**. Ils m'ont apporté une aide précieuse tout au long de ces trois années et ont contribué par leurs compétences respectives au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie la ferme aquacole « **Aquapole** » de l'île de Ré, où j'ai pu me procurer les poissons.

Merci à l'**Aquarium de La Rochelle** et particulièrement à Monsieur **Pierre Morinière** et son équipe pour l'aide apporté au conditionnement des poissons et pour leurs précieux conseils.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'**IFREMER** et du **Conseil régional Poitou-Charentes** auxquels j'adresse mes profonds remerciements.

Je tiens particulièrement à remercier l'ensemble des **doctorants** du CREMA, du LBEM et du LBSC sans qui ces trois années de recherche n'auraient pas été aussi agréables.

Enfin, je souhaite remercier mes amis, **Julien, Florie, Anne-Gaëlle, Luc, Anna, François et Zoé** pour leur soutien et les bons moments passés ensemble malgré ma mine parfois un peu piteuse. Je remercie également Nicos, le plus grand pizaiolo de France, et ses parents pour leur bonne humeur.

*Cette thèse est dédiée*

*à ma mère et à Michel,  
à mon frère,*

*à toi, Marjorie, pour ton soutien permanent et ta grande patience.*

# *Table des matières*

---

<b>AVANT PROPOS</b>	<b>1</b>
---------------------	----------

---

## **Etat de l'art**

---

<b>I- ACIDES GRAS</b>	<b>4</b>
-----------------------	----------

---

<b>A. PRESENTATION GENERALE</b>	<b>4</b>
<b>B. TRANSPORT PLASMATIQUE ET MEMBRANAIRE DES ACIDES GRAS.</b>	<b>6</b>
<b>C. METABOLISME DES ACIDES GRAS</b>	<b>8</b>
<b>D. ACIDES GRAS, PHOSPHOLIPIDES ET PROPRIETES MEMBRANAIRES</b>	<b>9</b>

<b>II- SYSTEME CARDIAQUE DES POISSONS</b>	<b>12</b>
---	-----------

---

<b>A. ANATOMIE DU CŒUR DE POISSON</b>	<b>12</b>
<b>B. MODULATION DE L'ACTIVITE CARDIAQUE PENDANT L'EFFORT</b>	<b>14</b>
<b>C. LE CŒUR: UN ROLE CLE DANS LES PERFORMANCES DE NAGES</b>	<b>17</b>

<b>III- LES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES</b>	<b>19</b>
---	-----------

---

<b>A. GENERALITES</b>	<b>19</b>
<b>B. ASPECTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES CARDIOMYOCYTES VENTRICULAIRES</b>	<b>21</b>
1- LA CAPACITE MEMBRANAIRE	21
2- LE POTENTIEL MEMBRANAIRE DE REPOS	21
3- LE POTENTIEL D'ACTION	22
4- LES COURANTS IONIQUES TRANSMEMBRANAIRES	24
<b>C. HOMEOSTASIE CALCIQUE ET PHENOMENE DE CONTRACTION</b>	<b>36</b>
1- HOMEOSTASIE CALCIQUE	36
2- LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION	38
<b>D. SURCHARGE CALCIQUE ET ARYTHMIES CARDIAQUES</b>	<b>41</b>

<b>IV- EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES ACIDES GRAS</b>	<b>44</b>
--	-----------

---

<b>A. EFFETS DES ACIDES GRAS SUR LE SYSTEME CARDIO-RESPIRATOIRE</b>	<b>44</b>
1- EFFETS SUR LA COMPOSITION TISSULAIRE	44
2- EFFETS SUR LES PERFORMANCES DE NAGE	45
3- EFFETS SUR LE METABOLISME	45
4- EFFETS CARDIAQUES	47
<b>B. EFFETS DES ACIDES GRAS SUR LES CARDIOMYOCYTES</b>	<b>48</b>
1- ACTIVITE ELECTRIQUE DES CARDIOMYOCYTES	48
2- EFFETS SUR L'HOMEOSTASIE CALCIQUE ET LA CONTRACTION	52

---

## **Matériels et méthodes**

---

<b>I- MATERIELS BIOLOGIQUES.</b>	<b>54</b>
----------------------------------	-----------

---

<b>A. ALIMENTATIONS EXPERIMENTALES</b>	<b>54</b>
<b>B. ANIMAUX EXPERIMENTAUX ET PROTOCOLE D'ALIMENTATION</b>	<b>54</b>
<hr/>	
<b>II- MESURE DES PERFORMANCES CARDIO-RESPIRATOIRES DES POISSONS.</b>	<b>56</b>
<hr/>	
<b>A. CHIRURGIE CARDIAQUE</b>	<b>56</b>
<b>B. TUNNEL DE NAGE</b>	<b>56</b>
<b>C. HYPOXIE</b>	<b>60</b>
<b>D. ANALYSES STATISTIQUES</b>	<b>62</b>
<hr/>	
<b>III- DISSOCIATION CELLULAIRE</b>	<b>64</b>
<hr/>	
<b>IV- LA TECHNIQUE DU PATCH-CLAMP</b>	<b>68</b>
<hr/>	
<b>A. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE</b>	<b>68</b>
<b>B. DISPOSITIF EXPERIMENTAL</b>	<b>70</b>
1- LE SYSTEME DE MICROSCOPIE	70
2- LE CIRCUIT ELECTRONIQUE	71
3- LE SYSTEME INFORMATIQUE	71
4- LES PIPETTES	71
5- SOLUTIONS EXPERIMENTALES	72
<b>C. LA PROCEDURE TECHNIQUE</b>	<b>75</b>
1- LA CONFIGURATION «WHOLE-CELL RECORDING» (WCR)	75
2- MESURE DE LA CAPACITE MEMBRANAIRE	75
<b>D. ANALYSES STATISTIQUES</b>	<b>77</b>

---

**Chapitre I: Effets des acides gras alimentaires sur les performances cardiaques et respiratoires des bars européens (*Dicentrarchus labrax*)**

---

<b><u>I-1 RELATION ENTRE LA COMPOSITION TISSULAIRE EN ACIDES GRAS ET LES PERFORMANCES CARDIAQUES ET RESPIRATOIRES DES BARS EUROPEENS (DICENTRARCHUS LABRAX).</u></b>		<b>78</b>
<hr/>		
RESULTS		89
DISCUSSION		92
<hr/>		
<b><u>I-2 EFFETS DES ACIDES GRAS ALIMENTAIRES SUR LA TOLERANCE A L'HYPOXIE DES BARS EUROPEENS (DICENTRARCHUS LABRAX)</u></b>		<b>112</b>
<hr/>		
INTRODUCTION		112
RESULTATS		115
EPREUVE D'HYPOXIE		115
EPREUVE DE NAGE SUITE A L'HYPOXIE		117
DISCUSSION		123

---

---

**Chapitre II: Effets aigus et chroniques de l'acide oléique sur l'activité des canaux calciques de type L des cardiomyocytes ventriculaires du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)**

---

<b><u>II-1 INHIBITION DU CANAL CALCIQUE DE TYPE L PAR L'ACIDE OLEIQUE DANS LES MYOCYTES CARDIAQUES DU BAR EUROPEEN (DICENTRARCHUS LABRAX)</u></b>	<b>127</b>
---	------------

---

RESULTS	137
DISCUSSION	140

<b><u>II-2 EFFET D'UNE ALIMENTATION RICHE EN ACIDES GRAS MONO-INSATURES SUR LES PROPRIETES BIOPHYSIQUES DU COURANT CALCIQUE DE TYPE L DES MYOCYTES VENTRICULAIRES CARDIAQUES DU BAR EUROPEEN (DICENTRARCHUS LABRAX)</u></b>	<b>154</b>
---	------------

---

INTRODUCTION	154
RESULTATS	156
DISCUSSION	160

---

---

---

<b><i>CONCLUSION GENERALE</i></b>	<b>162</b>
-----------------------------------	------------

---

BILAN DE L'ETUDE	162
MECANISMES D' ACTIONS DES ACIDES GRAS	163
ROLE DES ACIDES GRAS	164
PERSPECTIVES	169

<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>171</b>
-----------------------------	------------

---

<b><u>RESUME</u></b>	<b>189</b>
----------------------	------------

---

## Abréviations utilisées

Dans un souci de cohérence avec les articles insérés, certaines abréviations utilisées sont issues des mots anglais.

**AA:** acide arachidonique (20-4 n-6).

**ACP:** analyse à composante principale.

**ADP:** adénosine diphosphate.

**Ag:** acide gras

**AMP:** adénosine monophosphate.

**AMR:** « active metabolic rate », consommation d'oxygène maximale.

**AS:** aerobic scope, registre métabolique aérobie.

**ATP:** adénosine triphosphate.

**Bar HC:** bar nourri avec l'alimentation enrichie en huile de colza.

**Bar HFM:** bar nourri avec l'alimentation enrichie en huile de foie de morue.

**Bar HP:** bar nourri avec l'alimentation enrichie en huile de palme.

**BL.s<sup>-1</sup>:** « bodylength per second », longueur corporelle par seconde.

**CaBP:** « calcium binding protein », protéine de liaison au calcium.

**CEC:** couplage excitation contraction.

**CICR:** « calcium induced calcium release », libération de calcium induite par le calcium.

**Cm:** capacité membranaire.

**DHA:** « docosahexaenoic acid », acide docosahexaénoïque (22-6 n-3).

**DHP:** dihydropyridine.

**EC<sub>50</sub>:** concentration nécessaire à l'obtention de 50% d'inhibition.

**EPA:** « eicosapentaenoic Acid », acide écosapentaénoïque (20-5 n-3).

**FABP:** « fatty acid binding protein », protéine de liaison aux acides gras.

**HC:** huile de colza.

**HDL:** « high density lipoprotein », lipoprotéine de haute densité.

**HFM:** huile de foie de morue.

**HP:** huile de palme.

**I<sub>Ca,L</sub>:** courant calcique de type L.

**I<sub>Ca,T</sub>:** courant calcique de type T.

**I<sub>Cl<sub>Ca</sub></sub>:** courant chlorure activé par le calcium.

**IDL:** « intermediate density lipoprotein », lipoprotéine de densité intermédiaire.

**I<sub>K1</sub>:** courant potassique rectifiant entrant

**I<sub>K-ATP</sub>:** courant potassique dépendant du ratio ATP/ADP intracellulaire.

**IMR:** « immobile metabolic rate », consommation d'oxygène du poisson immobile.

**I<sub>Na</sub>:** courant sodique.

**IP3:** inositol triphosphate.

**I<sub>t</sub>:** courant transitoire entrant.

**I<sub>to</sub>:** courant potassique sortant transitoire.

**LA:** « linoleic acid », acide linoléique (18-2 n-6).

**LDL:** « low density lipoprotein », lipoprotéine de faible densité.

**MHC:** « myosin heavy chain », chaîne lourde de myosine.

**MLC:** « myosine light chain », chaîne légère de myosine.

**MO<sub>2</sub>:** consommation d'oxygène.

**MUFA:** « mono-unsaturated fatty acid », acide gras mono-insaturé.

**n-3 PUFA:** acide gras poly-insaturé de type n-3.

**NCX:** échangeur sodium calcium.

**NEFA:** « non esterified fatty acid », acide gras non estérifié.

**OA:** « oleic acid », acide oléique (18-1 n-9).

**PA:** potentiel d'action.

**Pi:** phosphate inorganique.

**PLB:** Phospholamban.

**PMCA:** pompe calcium ATPase de la membrane plasmique.

**PUFA:** « poly-unsaturated fatty acid », acide gras poly-insaturé.

**Q:** débit cardiaque.

**Q<sub>max</sub>:** débit cardiaque maximal.

**Q<sub>min</sub>:** débit cardiaque de routine.

**Qscope:** « cardiac scope », registre cardiaque.

**R<sub>m</sub>:** résistance membranaire.

**R<sub>p</sub>:** résistance pipette.

**R<sub>s</sub>:** résistance série.

**RS:** réticulum sarcoplasmique.

**RYR:** canaux calciques sensibles à la ryanodine

**SERCA:** pompe calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique.

**SFA:** « saturated fatty acid », acide gras saturé.

**TAG:** triacylglycérol.

**TTX:** tétrodotoxine.

**$U_{crit}$ :** vitesse de nage maximale d'un poisson.

**VES:** volume d'éjection systolique.

**VLDL:** « very low density lipoprotein », lipoprotéine de très faible densité.

**WCR:** « whole-cell recording », configuration cellule entière.

*Avant propos*

## **Avant propos**

Le bar (*Dicentrarchus labrax*), est un poisson téléostéen euryhalin qui fréquente les eaux estuariennes et côtières sur une zone de répartition s'étendant de La Mer du nord au nord des côtes africaines (Pickett et Pawson, 1994). Chez cette espèce les apports nutritionnels sont très divers et varient, tant qualitativement que quantitativement selon le stade de développement, la saison ou la population étudiée. Par le passé la grande majorité des recherches qui ont traité des effets de l'alimentation sur les performances des poissons ont considéré l'aspect quantitatif des apports nutritionnels (Martinez et al., 2002). Plus récemment, un nombre croissant de travaux ont mis en évidence l'importance de la qualité de l'alimentation sur les performances physiologiques et écologiques des poissons. Un des éléments essentiels du régime alimentaire d'un poisson est sa composition en acides gras. Les acides gras remplissent de nombreux rôles physiologiques. Ce sont notamment d'importants substrats métaboliques, des composants essentiels des membranes cellulaires et également des précurseurs d'hormones à activité paracrine et autocrine comme les eicosanoïdes.

La capacité de se mouvoir est une propriété fondamentale de la vie animale; elle est intimement associée à la notion de « fitness ». *In natura* les performances locomotrices d'un poisson déterminent non seulement son aptitude à rechercher et à capturer des proies, mais également sa capacité à échapper à un prédateur ou à réaliser le cycle migratoire associé à son cycle de vie. Il est généralement admis que les capacités de nage des poissons sont largement déterminées par les caractéristiques morpho-fonctionnelles du système cardio-respiratoires (Farrell, 2002; Claireaux et al., 2005). Il a de plus été démontré expérimentalement qu'au sein d'une population de bars, il existait une relation positive entre performances locomotrices, survie et croissance (Nelson et Claireaux, 2005).

Dans un autre registre, on constate que depuis 1984, la production aquacole a augmenté de plus de 10 % par année et que cette production est supposée doubler dans les dix prochaines années (Sargent et Tacon, 1999). Traditionnellement, l'aquaculture utilise des alimentations composées de farines de poissons. Toutefois, le déclin des stocks de poissons pélagiques associé à une demande toujours plus importante, contraint les professionnels à rechercher de nouvelles sources, notamment végétales, de protéines et

d'acides gras pour la fabrication des aliments. La première conséquence de cette nouvelle orientation est un changement qualitatif des apports en acides gras. Compte tenu du rôle biologique de ces molécules, il est essentiel d'appréhender les conséquences de tels changements sur la physiologie des poissons.

Chez le mammifère, un nombre important de travaux montre que l'apport alimentaire en acides gras peut avoir des conséquences multiples sur la physiologie, particulièrement sur la physiologie cardiaque (Sergiel et al., 1998; Pepe et McLennan, 2002; Nair et al., 1997). La plupart de ces expériences se sont focalisées sur l'étude des modalités d'action des acides gras sur les canaux ioniques des myocytes cardiaques (Xiao et al. 1997; 1998; Pepe et al., 1994; Honore et al., 1994). Ces canaux permettent le passage d'ions spécifiques au travers de la membrane plasmique. Ces mouvements ioniques sont fondamentaux au maintien de l'intégrité cellulaire et participent à un grand nombre de fonctions physiologiques. Parmi les différentes espèces ioniques, le calcium joue un rôle essentiel dans la majorité des mécanismes physiologiques comme la contraction musculaire, l'exocytose ou encore le métabolisme énergétique. Néanmoins, cet ion peut dans certaines conditions être à l'origine de différentes pathologies. C'est le cas notamment des arythmies cardiaques où l'homéostasie calcique est altérée. L'influx calcique nécessaire à la contraction cardiaque est assuré majoritairement par un canal ionique nommé canal calcique de type L. Ainsi, toute modulation par les acides gras de ce vecteur ionique membranaire va pouvoir affecter l'activité cardiaque.

Chez les poissons, la composition en acides gras de l'alimentation joue un rôle très important sur les performances natatoires, l'activité métabolique et la fonction cardiaque, (McKenzie et al., 1998; Wagner et al., 2004). Dans la littérature, il existe de nombreuses données contradictoires concernant les acides gras responsables de ces modulations. De plus, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus restent encore mal connus.

L'objectif de la présente étude est donc d'établir un lien entre la composition tissulaire en acides gras et les performances cardio-respiratoires du bar. Pour cela, trois alimentations enrichies différemment en acides gras avec de l'huile de colza (riche en acide oléique), de l'huile de palme (riche en acides gras saturés) et de l'huile de poisson (riche en acide gras poly-insaturés) ont été utilisées. Les poissons expérimentaux ont été nourris avec ces régimes pendant quatre mois puis leurs performances cardio-respiratoires

ont été mesurées au cours de tests de nage réalisés en suivant un protocole standardisé. Ces tests ont nécessité l'utilisation d'un respiromètre. Par la suite, afin de mieux comprendre les différences de performances cardiaques observées en fonction de l'alimentation reçue, la technique du patch clamp a été utilisée pour mesurer dans un premier temps les effets aigus d'un acide gras (l'acide oléique) sur le canal calcique de type L. Dans un second temps, pour comparer l'activité du canal calcique de type L cardiaque pour deux alimentations enrichies en huile de poisson ou en huile de colza (effets chroniques).

*Etat de l'art*

## **I- Acides gras**

### **A. Présentation générale**

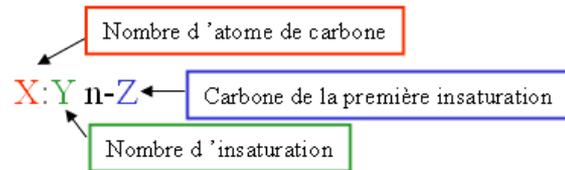
Les acides gras (Ag) sont des molécules hydrophobes de la classe des lipides. Ce sont des acides carboxyliques composés d'une chaîne de 4 à 36 atomes de carbone qui possèdent un groupement carboxyle à une extrémité et un groupement méthyle à l'autre. Pour certains acides gras, appelés acides gras saturés (SFA), cette chaîne est dépourvue de double liaison et est non ramifiée. D'autres Ag, contiennent une ou plusieurs doubles liaisons et sont désignés respectivement acides gras mono-insaturés (MUFA) et poly-insaturé (PUFA). Une nomenclature simplifiée précise, d'une part la longueur de la chaîne (A), d'autre part le nombre de doubles liaisons (B) présentes sur celle-ci. A et B sont séparés par deux points. La position de la première « insaturation » sur la chaîne carbonée est notée sous la forme n-X où X représente le numéro du carbone portant cette « insaturation ». Ainsi, tous les acides gras peuvent être représentés sous la forme A:B n-X (Figure 1). Les acides gras les plus communs possèdent des nombres pairs d'atomes de carbone dans une chaîne non ramifiée de 12 à 24 atomes de carbone. Les doubles liaisons de presque tous les acides gras naturels insaturés ont une configuration cis.

Certains acides gras dits essentiels, tels que l'acide linoléique (18:2 n-6), l'acide linoléique (18:3 n-3), l'acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3), ne sont pas synthétisés par les poissons. Leur apport par la nourriture est donc indispensable.

Dans un organisme, les acides gras jouent différents rôles biologiques. Ce sont d'importants substrats métaboliques notamment pour le cœur. Ils sont utilisés comme composant oxydable afin de générer de l'énergie pour les processus contractiles, le transport ionique, les processus anaboliques et la maintenance de l'intégrité cellulaire. Ce sont également des substrats pour la synthèse des phospholipides, qui sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. Certains acides gras sont des précurseurs de la synthèse d'hormones. Chez les vertébrés, les eicosanoïdes sont des dérivés de l'acide arachidonique et possèdent des actions de types hormonales sur différents tissus. Ils agissent de façon para et autocrine. Cette famille de composés est particulièrement

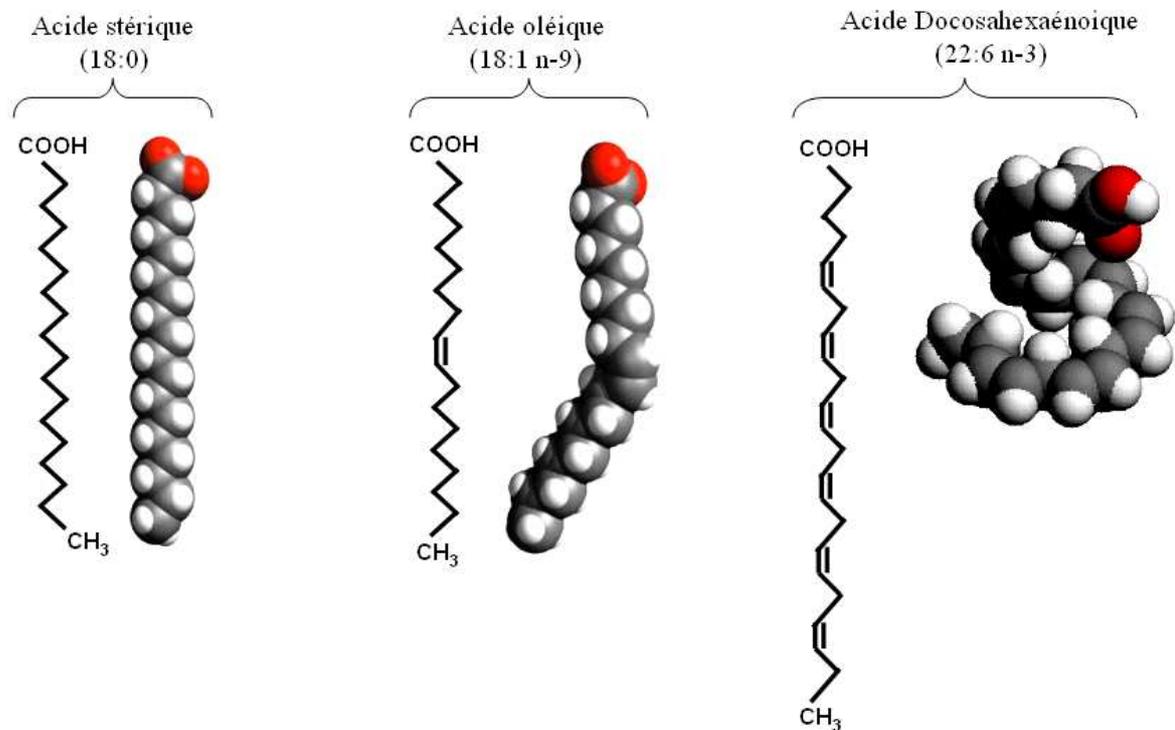
**Figure 1**

Dénomination commune	Dénomination simplifiée
<b>Acides gras saturés</b>	
Myristique	14:0
Palmitique	16:0
Stéarique	18:0
Arachidonique	20:0
<b>Acides gras mono-insaturés</b>	
Oléique	18:1 n-9
<b>Acides gras poly-insaturés de la série n-6</b>	
Linoléique	18:2 n-6
Arachidonique	20:4 n-6
<b>Acides gras poly-insaturés de la série n-3</b>	
Linoléénique	18:3 n-3
Ecosapentaénoïque (EPA)	20:5 n-3
Docosahexaénoïque (DHA)	22:6 n-3



Nomenclature des acides gras.

Tableau regroupant les principaux acides gras des différentes classes

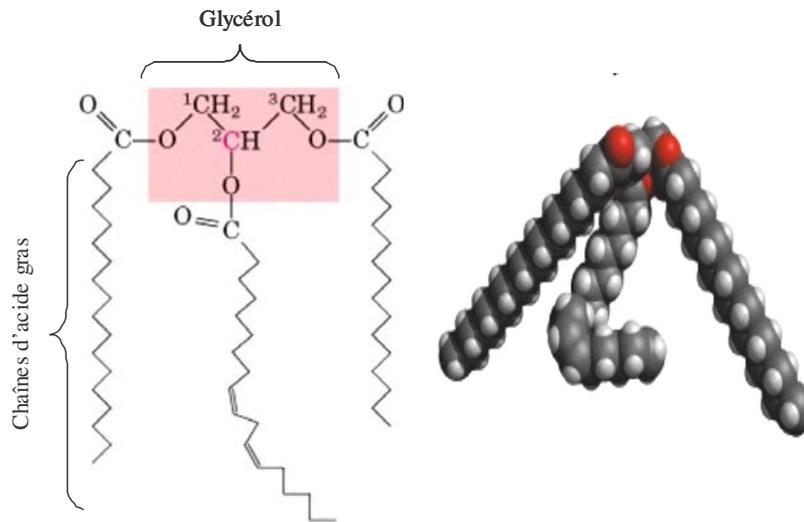


Exemple de la formule développée et de la structure en trois dimensions d'un acide gras saturé (acide stéarique), mono-insaturé (acide oléique) et poly-insaturé (acide docosahexaénoïque).

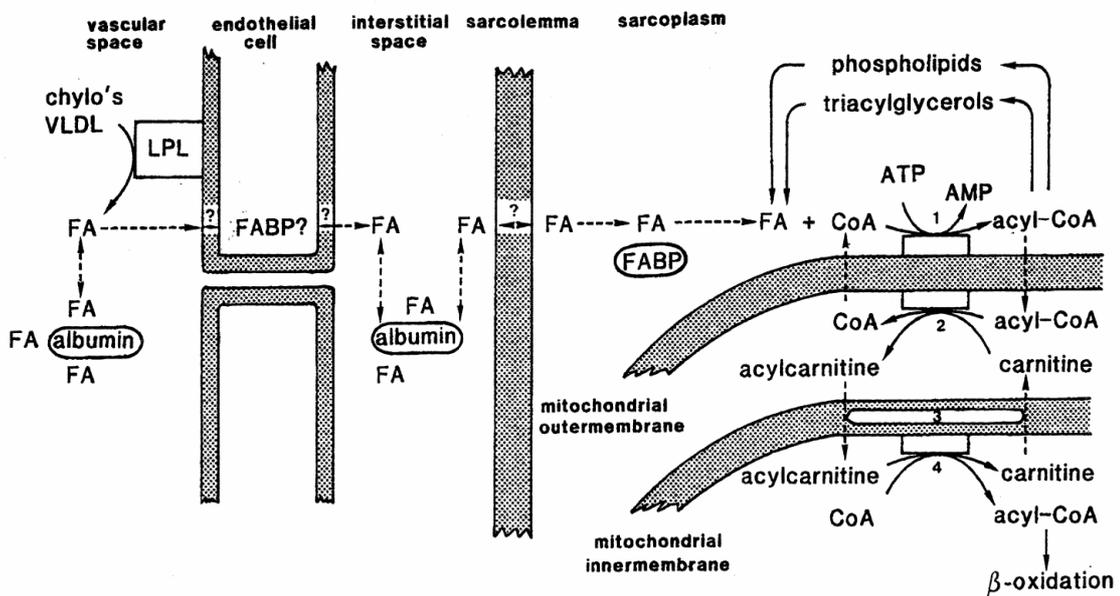
impliquée dans la reproduction, l'inflammation, la fièvre, la régulation de la pression sanguine. Classiquement on distingue trois catégories d'eicosanoïdes: les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes.

## **B. Transport plasmatique et membranaire des acides gras.**

Les Ag sont présents dans le sang sous la forme de molécules non estérifiées, ou estérifiées incorporées en mono, di et triacylglycérol, phospholipides et ester cholesteryl (Abraham et al., 1987). Etant donné le caractère hydrophobique des Ag, ils ne peuvent pas être transportés dans le sang sous leurs formes libres non estérifiées. Dans le plasma sanguin, la solubilisation des acides gras non estérifiés ou NEFA est favorisée par leur liaison à l'albumine. Les Ag sont également transportés sous la forme de triacylglycérols (TAG), ester de trois Ag à longue chaîne et d'une molécule de glycérol (Delcher et al., 1965 ; Frederickson et Gordon, 1958 ; Harris et al., 1980; figure 2.A). Dans la circulation sanguine, les molécules hydrophobiques de TAG forment le cœur de particules lipoprotéiques (Dolphin, 1985). En fonction de leur taille, de leur site de formation ou de leur composition chimique, ces particules sont appelées chylomycrons, lipoprotéines de très faible densité (« very low density lipoprotein », VLDL), lipoprotéines de densité intermédiaire (« intermediate density lipoprotein », IDL), lipoprotéines de faible densité (« low density lipoprotein », LDL) ou lipoprotéines de haute densité (« high density lipoprotein », HDL). Les acides gras sont ainsi transportés par voie sanguine jusqu'aux organes cibles. Si la proportion d'acides gras transportés sous forme estérifiée ou non estérifiée est relativement bien connue chez les vertébrés supérieurs (Mougios et al., 1998; Layden et al., 2004), chez les poissons en revanche elle n'a pas été déterminée. Une étude de Spector (1968) montre que les lipides sont principalement transportés sous la forme de NEFA entre les zones de réserve et les tissus cibles. Toutefois, une étude plus récente de Weber et al. (2002) sur la truite arc-en-ciel précise que les acides gras seraient principalement transportés sous leur forme estérifiée (92 %) tandis que la forme non estérifiée complexée à l'albumine ne représenterait que 8 % des Ag transportés.

**Figure 2**

- A.** Représentation schématique d'une molécule de triacylglycérol. Chaque molécule d'acides gras est reliée par l'intermédiaire de l'atome d'oxygène de son groupement carboxyle à un atome de carbone de la molécule de glycérol.



- B.** Schéma représentant la récupération, le transport, et l'activation des acides gras non estérifiés dans le tissu cardiaque. Les numéros indiquent les différentes enzymes impliquées au niveau mitochondriale: 1- acyl-CoA synthetase, 2- carnitine acyltransferase I, 3- carnitine acylcarnitine translocase, 4- carnitine acyltransferase II. FABP: fatty acid binding protein. FA: acides gras non estérifiés. (Van Der Vusse et al., 1992).

Au niveau cardiaque, les TAG des lipoprotéines sont hydrolysés par une lipoprotéine lipase présente à la surface luminale de l'endothélium vasculaire (Aida et al., 1973). Les produits de l'hydrolyse des TAG sont principalement des NEFA et des monoacylglycérols. Dans le cœur, les NEFA complexés à l'albumine sont extraits d'une manière très efficace. Une fois libérée de l'albumine, ou suite à l'hydrolyse des TAG, les NEFA traversent la membrane luminale des cellules endothéliales. Il a été suggéré que la diffusion dans le compartiment cytoplasmique des cellules endothéliales était facilitée par des protéines intracellulaires appelées « fatty acid binding protein » ou FABP (Stewart et al., 1988; Vayda et al., 1998). Après translocation au travers de la membrane cytoplasmique, les NEFA diffusent dans l'espace interstitiel entre les cellules endothéliales et parenchymateuses du cœur. La diffusion interstitielle serait médiée par l'albumine. Le sarcolemme est traversé de façon passive ou facilitée par des protéines membranaires spécifiques identifiées comme étant des FABP de la membrane plasmique. Après translocation, la liaison à des FABP pourrait favoriser le transport cytoplasmique jusqu'aux sites d'utilisation des Ag (Figure 2.B). L'importance relative entre ces deux processus de translocation facilitée ou passive reste encore mal connue.

### **C. Métabolisme des acides gras**

Dans la cellule, les Ag sont soit oxydés pour la production d'énergie, soit incorporés dans les phospholipides, TAG et autres lipides complexes. Dans les conditions de normoxie, les Ag se présentent comme les substrats préférentiellement utilisés par le métabolisme aérobie (Hochachka and Somero, 1984; Watanabe, 1982) pour la production d'ATP. Le métabolisme des Ag dans les tissus est essentiellement le même chez les poissons et les mammifères. Avant d'intégrer la voie catabolique, qui conduit à l'oxydation partielle et/ou complète de la molécule d'Ag, ou d'être incorporé dans le pool cellulaire de lipides estérifiés, le groupement carboxylique de l'Ag doit être converti en CoA-thioester (Normann et al., 1983; Figure 2.B). La conversion de l'Ag en ester de l'acyl-CoA est catalysée par la « long chain acyl-CoA synthétase » qui est principalement localisée sur la face externe de la membrane externe de la mitochondrie (Normann et al., 1983). L'énergie nécessaire à l'activation de la réaction est fournie par l'hydrolyse d'ATP en AMP. Sur la face interne de la membrane externe de la mitochondrie, la carnitine acyltransferase va permettre la transformation de l'ester acyl-CoA en acylcarnitine. L'acylcarnitine va

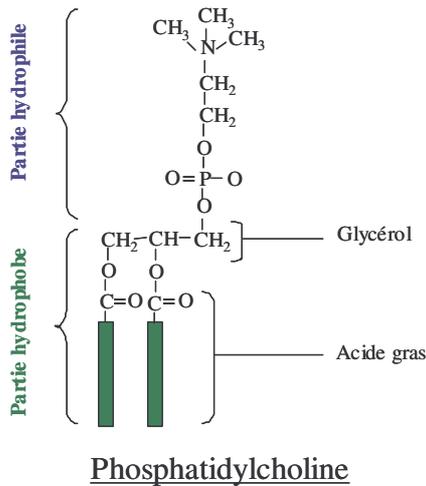
traverser la membrane interne de la mitochondrie où il sera reconverti en acyl-coA par la carnitine transférase. Dans la matrice mitochondriale, l'acyl-coA sera utilisé pour la  $\beta$ -oxydation où il va permettre la formation d'ATP. Cet ATP sera ainsi disponible pour l'ensemble des processus nécessitant de l'énergie comme la contraction cardiaque ou l'activité de transporteurs ioniques.

## **D. Acides gras, phospholipides et propriétés membranaires**

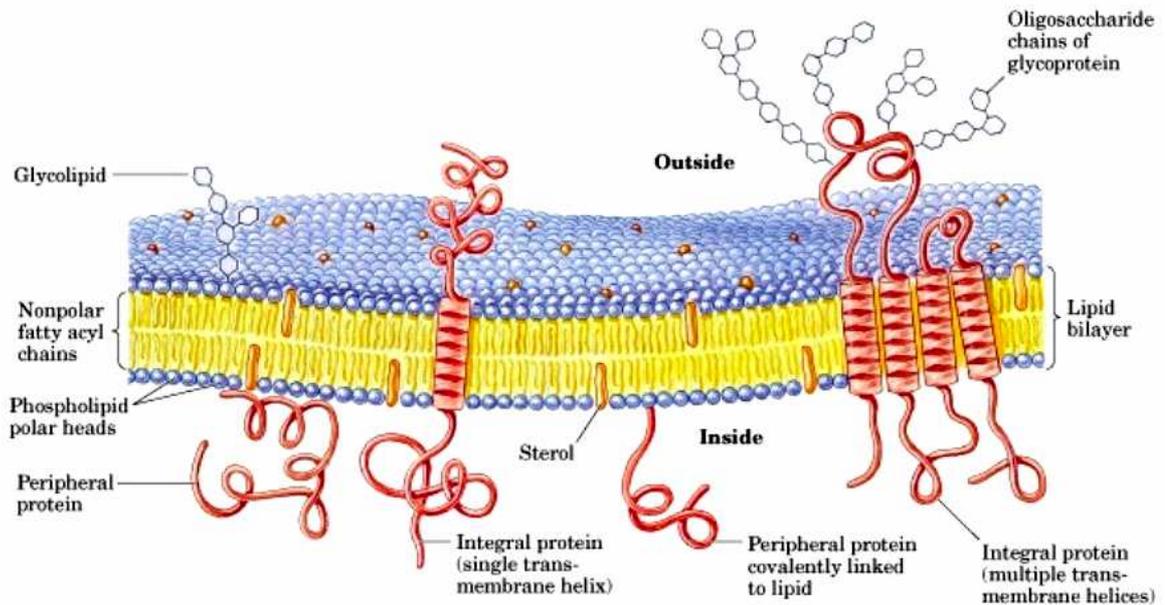
Toutes les membranes biologiques contiennent une quantité non négligeable de phospholipides, en majorité les glycérophospholipides dont la base est le glycérol. Les molécules de phospholipides possèdent une queue hydrophobe composée de deux acides gras à longue chaîne liés de manière covalente aux carbones 1 et 2 de la molécule de glycérol. Le troisième atome de carbone du glycérol est lié de façon covalente *via* du phosphate à une molécule alcool. La nature de ce groupement hydrophile est déterminée par la composition chimique de la fraction alcoolique. Dans le tissu cardiaque, les alcools les plus communs attachés au groupement phosphate sont la choline, l'éthanolamine, la sérine, l'inositol et le glycérol (figure 3.A). La partie hydrophobe des phospholipides est formée par la chaîne d'acides gras. Le nombre d'atomes de carbone de la chaîne aliphatique est généralement compris entre 14 et 24. La composition en Ag des phospholipides varie en fonction de plusieurs facteurs incluant la composition de l'alimentation ainsi que l'espèce animale étudiée (Charnock et al., 1984, 1986 ; Bell et al. 2001, 2002).

La bicouche phospholipidique est l'unité structurale de base des membranes biologiques. Dans le sarcolemme, les parties hydrophiles des phospholipides du feuillet interne de la membrane sont orientées vers le milieu intracellulaire, tandis que la partie hydrophile des phospholipides du feuillet externe de la membrane est orientée vers le milieu extracellulaire. Les parties hydrophobes des phospholipides sont dans la partie interne de la bicouche phospholipidique (figure 3.B). Cette bicouche phospholipidique possède une fluidité bidimensionnelle qui dépend de sa composition et varie avec la température. Dans les membranes naturelles, l'agitation thermique des molécules provoque la rotation libre des phospholipides autour de leur axe longitudinal et leur diffusion latérale

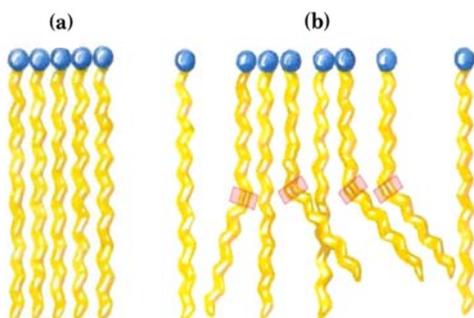
dans le plan du feuillet membranaire. Ces mouvements n'empêchent pas les chaînes d'Ag de rester dans le cœur hydrophobe de la membrane. Les propriétés physiques telles que le point de fusion des acides gras et des phospholipides qui les contiennent sont essentiellement déterminées par la longueur et le degré d'insaturation de leur chaîne hydrocarbonée. En effet, les doubles liaisons de presque tous les acides gras naturels sont en configuration *cis*. Cette configuration crée une pliure dans leur chaîne carbonée. Les acides gras avec une ou plusieurs de ces pliures ne peuvent donc pas s'associer aussi étroitement que le font les acides gras saturés; leurs interactions électrochimiques sont plus faibles (Figure 3.C). L'énergie requise pour créer un désordre de ces dispositions est donc plus faible et, à longueur de chaîne égale, leur point de fusion sont inférieurs à ceux d'Ag saturés. Ainsi, plus la chaîne carbonée d'un Ag est « insaturée », plus celui-ci sera susceptible d'augmenter la fluidité membranaire.

**Figure 3.**

- A. Exemple de structure moléculaire d'un phospholipide: la phosphatidylcholine. Deux acides gras sont liés de manière covalente aux carbones 1 et 2 de la molécule de glycérol. Le carbone 3 du glycérol est relié à la choline par l'intermédiaire du phosphate.



- B. Schéma de structure d'une membrane biologique. La membrane est composée d'une bicouche phospholipidique dans laquelle sont enchâssées différentes protéines intégrales (comme les canaux ioniques) et périphériques.



- C. Différences structurales entre un feuillet lipidique constitué d'acides gras saturés (a) et un feuillet lipidique constitué d'un mélange d'acides gras saturés et insaturés (b).

## **II- système cardiaque des poissons**

### **A. Anatomie du cœur de poisson**

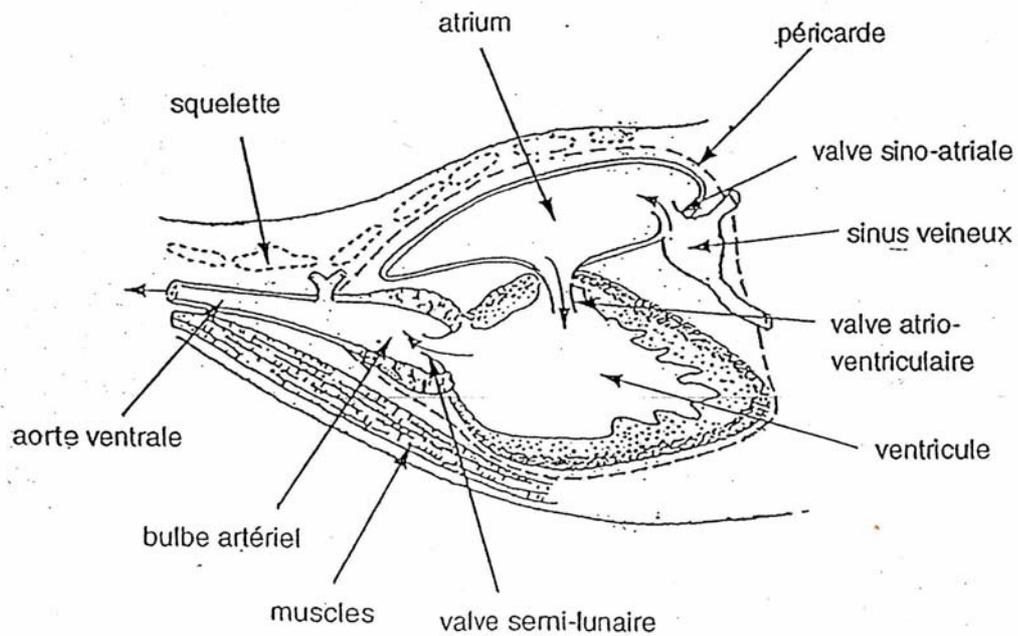
Le cœur des poissons téléostéens est contenu au sein d'un sac péricardique et est constitué de 4 chambres en séries: un sinus veineux, une oreillette, un ventricule et un bulbe artériel. Le sang veineux pénètre le sinus veineux à partir de la veine hépatique et des canaux de cuvier. Il circule ensuite dans l'oreillette, puis dans le ventricule avant de rejoindre l'aorte ventrale via le bulbe artériel (figure 4). Toutes les chambres, à l'exception du bulbe artériel, sont contractiles. Elles sont séparées par des valves au niveau de la jonction sino-atriale et atrio-ventriculaire ainsi qu'au niveau de la jonction entre le ventricule et le bulbe artériel. Ces valves permettent le maintien d'un flux sanguin unidirectionnel dans le cœur. L'ouverture et la fermeture des valves sont déterminées par le différentiel de pression sanguine de part et d'autre de celles-ci.

**Le sinus veineux:** Il constitue un réservoir aux parois minces et extensibles. Il est généralement faiblement contractile et est également le site du tissu « pacemaker » qui va permettre d'initier les battements cardiaques.

**L'oreillette:** Chez les poissons, contrairement aux mammifères, le volume de l'oreillette est approximativement identique à celui du ventricule. Sa paroi est mince, peu extensible et possède un maillage de fins trabécules musculaires. La contraction de l'oreillette est la principale cause de remplissage du ventricule.

**Le ventricule:** C'est la principale chambre contractile du cœur et il représente la plus grande masse musculaire du cœur. Chez les poissons, la masse ventriculaire représente 0.05 à 0.4 % de la masse corporelle (Farrell et Jones, 1992). La taille du ventricule, sa forme, son histologie ainsi que sa vascularisation varient considérablement d'une espèce à l'autre (Santer, 1985). Cette plasticité reflète les différences interspécifiques substantielles du volume d'éjection systolique (VES; volume de sang éjecté à chaque contraction) et de la pression sanguine générée. Le ventricule possède deux types de muscles:

**Figure 4.**



Représentation schématique du cœur d'un poisson téléostéen. Les flèches indiquent le sens de la circulation sanguine. (modifié d'après Satchell, 1991).

- *Spongiosa*, un réseau spongieux de trabécules musculaires qui constitue la plus grande proportion de la masse ventriculaire de presque tous les poissons.
- *Compacta*, une couche musculaire plus compacte enfermant le *spongiosa* interne (Santer 1985, Tota 1989, Davie et Farrell 1991).

Le cœur de la plupart des téléostéens est uniquement composé de la *spongiosa* qui n'est pas vascularisée. Le sang veineux contenu dans le lumen et l'espace intra-trabéculaire du ventricule (sang luminal) serait donc la seule source d'oxygène pour ces types de myocardiens. Tous les élasmobranches et environ 25% des téléostéens possèdent un muscle cardiaque regroupant *spongiosa* et *compacta*. Pour la plupart de ces téléostéens, une circulation coronarienne irrigant la *compacta* constitue une source additionnelle d'oxygène pour le myocarde. Les élasmobranches et les espèces de téléostéens très actives présentent en outre une vascularisation coronarienne de la *spongiosa*.

**Le bulbe artériel:** c'est une chambre élastique non contractile qui s'étend à chaque battement cardiaque afin d'absorber le flux pulsatile de sang éjecté du ventricule, créant ainsi un flux de sang plus continu dans la circulation systémique.

Tout le sang pompé par le ventricule va ensuite entrer dans la circulation respiratoire (branchiale) par 4 à 7 branches bilatérales à partir de l'aorte ventrale. Lorsque le sang passe par la zone d'échange respiratoire des branchies, il perd le CO<sub>2</sub> et se charge en oxygène. Le sang oxygéné est ensuite collecté dans les artères efférentes dorsales pour être distribué aux tissus de l'organisme par le biais de la circulation primaire et secondaire (Farrell et Jones, 1992).

## **B. Modulation de l'activité cardiaque pendant l'effort**

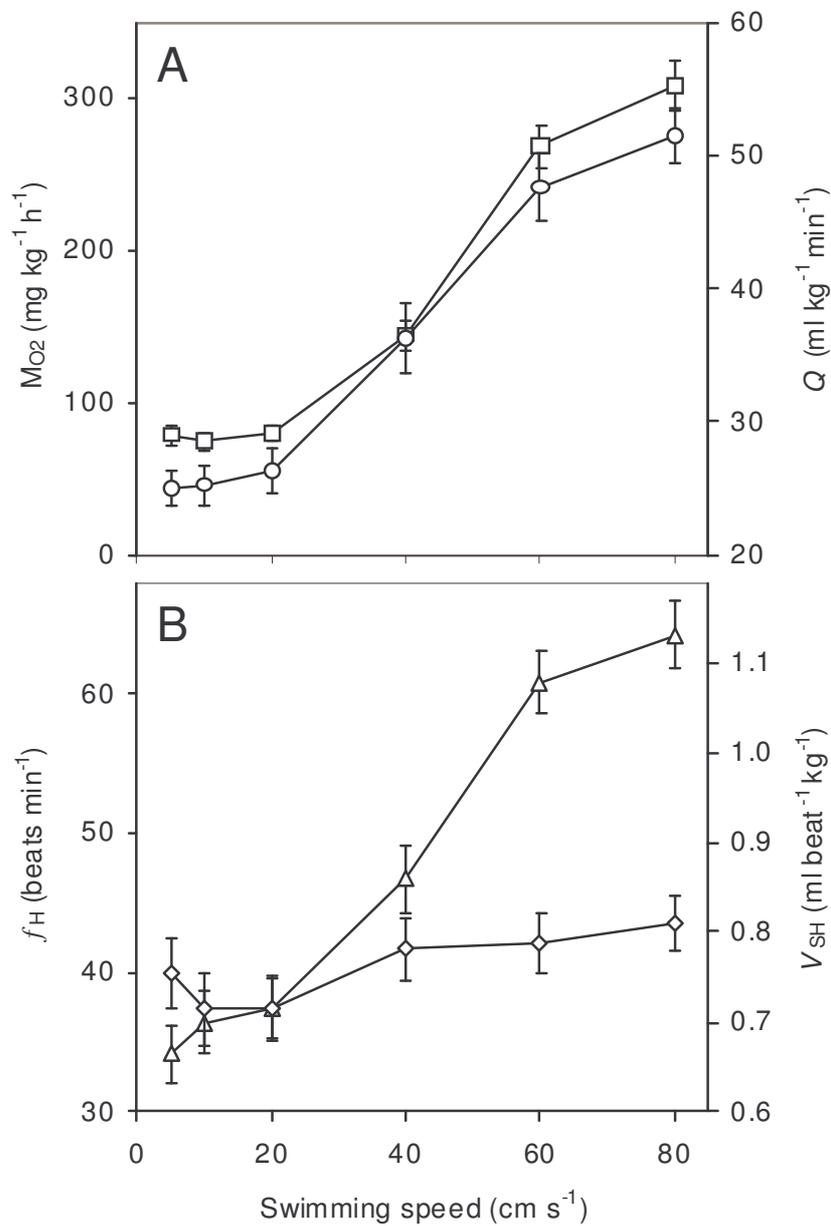
Au cours d'un effort musculaire intense, la modulation de l'activité cardiaque vise à assurer l'approvisionnement des tissus en oxygène et en nutriments tout en permettant l'évacuation des produits du métabolisme et notamment le CO<sub>2</sub>.

L'étude de l'activité cardiaque des poissons est généralement réalisée *in vivo* par l'intermédiaire d'épreuves de nage. Ces épreuves s'effectuent à l'aide d'un tunnel de nage

permettant d'imposer au poisson un effort musculaire contrôlé. Il est alors possible de mesurer l'évolution de divers paramètres physiologiques tels que la consommation d'oxygène, le rythme et le débit cardiaque en fonction de l'effort imposé. Lors d'une épreuve de nage, le débit cardiaque des poissons augmente de façon exponentielle avec la vitesse de nage. Chez le bar Européen (*Dicentrarchus labrax*), des expériences effectuées à 15°C ont montré un doublement du débit cardiaque entre la valeur de repos et la valeur maximale. Le débit cardiaque atteint ensuite un plateau lorsque la vitesse est proche de la vitesse critique de nage ( $U_{crit}$ , vitesse maximale à laquelle les poissons peuvent nager; Chatelier et al., 2005). Le débit cardiaque est le produit du volume d'éjection systolique (VES) et du rythme cardiaque. Chez presque tous les poissons étudiés à ce jour, l'augmentation de VES (inotropisme) est responsable d'au moins 50% de l'augmentation du débit cardiaque observé pendant l'exercice (Farrell et Jones, 1992; Kolok et Farrell, 1994a, 1994b; Thorarensen et al., 1996a; Gallagher et al., 2001). Toutefois, chez le bar européen, 90% de l'augmentation du débit cardiaque est attribuable à une augmentation de fréquence cardiaque (chronotropisme) (figure 5.A; Chatelier et al., 2005). Comme pour le bar, d'autres poissons tels que le thon et quelques téléostéens antarctiques sont capables de réguler principalement leur rythme cardiaque pendant l'effort (Axelson et al., 1992; Farrell et Jones, 1992; Farrell, 1996; Thorarensen et al., 1996a; Brill et Bushnell, 2001).

Chez le poisson, il existe deux voies principales de régulation du débit cardiaque: le système sympathique et parasympathique.

**Voie de régulation sympathique:** C'est une voie très importante chez les poissons. Elle met en jeu deux catégories de catécholamines, l'adrénaline et la noradrénaline. L'adrénaline est synthétisée par des cellules regroupées en amas nommés tissus chromaffines localisés au sein des veines cardinales supérieures (Reid et al., 1998). Cette molécule va donc agir sur le tissu cardiaque par la voie humorale. La noradrénaline est libérée à partir de fibres nerveuses innervant le cœur. Chez les téléostéens, les effets liés à l'adrénaline sont prédominants comparés à ceux occasionnés par la noradrénaline. Dans le cœur, les récepteurs des catécholamines sont de deux types:  $\alpha$  et  $\beta$ . La présence et la densité de ces récepteurs varient selon les tissus et les espèces concernés. Par exemple chez la carpe, seul le récepteur  $\alpha$  a été isolé dans les cardiomyocytes ventriculaires (Vornanen, 1989). Chez la truite arc-en-ciel, l'adrénaline augmente la force de contraction après fixation sur des récepteurs  $\beta$  adrénergiques (Farrell et al., 1986). Généralement, les

**Figure 5.**

Effet de l'augmentation de la vitesse de nage sur (A) la consommation d'oxygène ( $\text{MO}_2$ , carrés), le débit cardiaque ( $Q$ , rond), (B) le rythme cardiaque ( $f_H$ , triangle) et le volume d'éjection systolique ( $V_{SH}$ , losange) de bars acclimatés à  $15^\circ\text{C}$  (Chatelier et al., 2005).

catécholamines, en se liant aux récepteurs  $\beta$  adrénergiques, génèrent un effet inotrope par contraction ventriculaire (Farrell, 1984) et chronotrope par entraînement des cellules pacemaker du sinus veineux.

**Voie de régulation parasympathique:** Elle passe par l'action de l'acétylcholine libérée par le nerf vague localisé dans le tissu pacemaker et atrial. Ce neurotransmetteur va induire des effets inotropes et chronotropes négatifs *via* la stimulation des récepteurs muscariniques. Bien que le ventricule ne soit pas innervé par les fibres vagales, le débit cardiaque va être grandement affecté par le contrôle inotropique de l'oreillette, qui régule directement le remplissage du ventricule (Taylor et al., 1999). De plus, le tissu de pacemaker étant le siège de l'autorythmicité cardiaque, l'effet chronotropique négatif de l'acétylcholine sur celui-ci va directement se répercuter sur le tissu ventriculaire.

## **C. Le cœur: un rôle clé dans les performances de nages**

Chez les poissons migrateurs actifs comme les salmonidés, la capacité à maintenir un effort musculaire soutenu est supposée être directement reliée à la capacité du cœur à générer le flux sanguin adéquat (Farrell 2002, Claireaux et al., 2005). En effet, l'augmentation de débit cardiaque pendant l'effort est nécessaire pour assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments aux différents organes, permettant ainsi le maintien de l'exercice aérobie. Il existe relativement peu d'informations sur les performances cardiaques pendant l'exercice chez les autres espèces de téléostéens.

Il est généralement admis que les performances métaboliques maximales, mesurées durant un test de nage, mobilise toute la capacité de pompage cardiaque des salmonidés. Comme décrit précédemment chez le bar, la consommation d'oxygène et le débit cardiaque de la majorité des téléostéens atteignent un plateau lorsque le poisson approche de sa vitesse maximale de nage, c'est-à-dire des limites de sa capacité métabolique aérobie (figure 5.A) (Kiceniuk et Jones, 1977; Chatelier et al., 2005 ; Kolok et Farrell, 1994a). Le cœur des poissons reçoit majoritairement son oxygène du sang veineux qui le traverse et qui est issu des tissus périphériques. Chez les salmonidés, la circulation veineuse contient

au moins vingt fois plus d'oxygène que les besoins du myocarde (Farrell, 1993). Pendant un exercice musculaire intense, en revanche, cette situation change considérablement. En effet, au cours d'une épreuve de nage, le travail cardiaque maximal est trois à cinq fois supérieur aux valeurs de repos tandis que l'oxygène dans le retour veineux diminue (Farrell et Jones, 1992). Il en résulte alors un accroissement de la consommation d'oxygène du myocarde directement proportionnel à cette augmentation de travail (Farrell et al., 1985; Farrell, 1993). Parallèlement, l'amplification de l'extraction d'oxygène par les muscles squelettiques, diminue la quantité d'oxygène disponible dans le sang veineux. Chez la truite arc-en-ciel, cette disponibilité en oxygène est environ cinq fois inférieure à la valeur de repos lorsque le poisson atteint sa vitesse maximale de nage (Kiceniuk et Jones, 1977). Bien que la circulation coronarienne des salmonidés augmente pendant l'exercice (Axelson et Farrell, 1993 ; Gamperl et al., 1995), elle peut s'avérer insuffisante dans certaines conditions. Par exemple, des études réalisées en hypoxie révèlent que la hausse du flux coronarien atteint sa limite bien avant que l'augmentation du travail cardiaque soit maximale. Ainsi, pendant un effort musculaire intense, les besoins cardiaques en oxygène augmentent tandis que l'apport en oxygène diminue suite à l'amplification de l'extraction d'oxygène par les muscles squelettiques et à un flux coronarien insuffisant. Dans ces conditions, si l'apport en oxygène est trop faible pour combler les besoins métaboliques du cœur, les performances cardiaques vont être limitées suite à une hypoxie myocardique (pour revue voir Farrell, 2002). Cette limitation conduirait à un débit cardiaque insuffisant pour permettre le transport d'énergie et de matière nécessaires au maintien de l'exercice aérobie.

Le cœur est un organe central dans la détermination des capacités de nage des poissons. Il joue un rôle primordial pour leur survie dans leur milieu naturel. La diminution de la quantité d'oxygène disponible pour le cœur peut avoir de nombreuses répercussions sur la physiologie des myocytes ventriculaires cardiaques. En particulier, cette baisse peut avoir des conséquences sur l'activité électrique et contractile des cardiomyocytes, en modulant le potentiel énergétique cellulaire et/ou les flux ioniques transmembranaires. Ainsi, la compréhension de ces mécanismes cellulaires et moléculaires régissant l'activité électrique et contractile cardiaque, permettrait une meilleure compréhension des facteurs limitant, ou améliorant, les capacités cardiaques des poissons.

### III- Les cardiomyocytes ventriculaires

#### A. Généralités

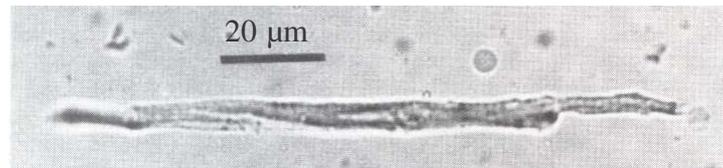
Les cardiomyocytes ventriculaires des poissons ont une taille inférieure à celle des mammifères. Ils mesurent de 1,7 à 4,6  $\mu\text{m}$  de diamètre chez la truite arc-en-ciel (Santer, 1985) contre 10 à 25  $\mu\text{m}$  chez les mammifères (Canelle et al., 1986). Ils possèdent une membrane cellulaire ou sarcolemme qui délimite le cytoplasme nommé le sarcoplasme. En plus du noyau, du cytosquelette et des protéines contractiles, le sarcoplasme contient de nombreux organites et granulations, en particulier: des ribosomes, des grains de glycogènes, des mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum sarcoplasmique et des corps gras. L'observation en microscopie photonique des myocytes ventriculaires isolés de poisson montre une cellule de forme rectangulaire très allongée (Figure 6). Ces myocytes présentent un aspect strié typique où chaque strie correspond à l'extrémité d'un sarcomère.

Chaque myocyte ventriculaire est connecté avec plusieurs cellules adjacentes pour constituer des faisceaux musculaires. Les contacts entre myocytes s'établissent au niveau des disques intercalaires, constituant ainsi un syncytium fonctionnel. Trois zones spécialisées sont identifiées le long d'un disque intercalaire:

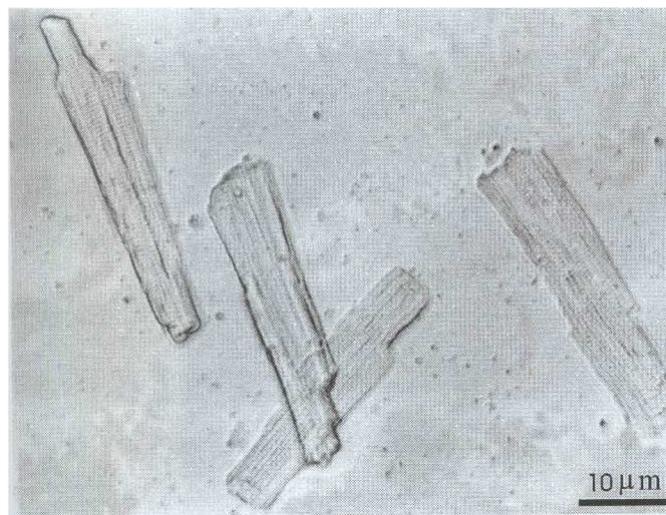
- La *Fascia adherens* ou le disque est le résultat de l'accolement des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes, sur lequel s'insèrent les sarcomères au niveau d'une ligne Z.
- La *macula adherens* ou desmosome, est un petit segment semi circulaire sans insertion sarcomérique.
- Les *nexus*, véritables soudures entre les membranes des deux cellules. C'est à ce niveau que se trouvent des jonctions communicantes appelées jonctions gap. Ces jonctions sont des zones de plus faible résistance électrique facilitant la conduction des potentiels d'actions. Elles permettent également le passage de molécules hydrophiles de tailles limitées.

---

**Figure 6**



**A.** Photographie d'un cardiomyocyte ventriculaire d'un poisson téléostéen (Vornanen, 1997).



**B.** Photographie d'un cardiomyocyte ventriculaire de rat adulte.

## **B. Aspects électrophysiologiques des cardiomyocytes ventriculaires**

### **1- La capacité membranaire**

Selon le modèle électrique de Hodgkin et Huxley (1952) qui décrit le comportement d'une membrane biologique dans des conditions de voltage imposé, le courant peut franchir la membrane, soit en chargeant la capacité membranaire ( $C_m$ ), soit en étant porté par des ions à travers des résistances ohmiques disposées en parallèle à la capacité. Avec la technique du patch clamp en configuration cellule entière (Hamill et al., 1981) il est possible d'accéder à certaines caractéristiques électrophysiologiques passives de la membrane telle que la  $C_m$ . La  $C_m$  constitue un paramètre intéressant permettant d'apprécier la surface membranaire et donc d'avoir une estimation de la taille d'une cellule. Des mesures de la  $C_m$  de myocytes ventriculaires de cœurs de mammifères adultes ont donné des valeurs de 80-250 pF (Benndorf et al., 1985 ; Balke et al., 1992). Ces mêmes mesures réalisées chez les poissons estiment la  $C_m$  entre 21 et 43 pF (Haverinen et Vornanen, 2004). Ceci confirment que les cardiomyocytes ventriculaires de poissons présentent une surface membranaire quatre à cinq fois inférieure à celle des mammifères.

### **2- Le potentiel membranaire de repos**

Les propriétés physico-chimiques de la membrane plasmique des cellules permettent le maintien d'un gradient de concentration ionique entre le milieu extra et intracellulaire. Cette différence de composition ionique de part et d'autre de la membrane est à l'origine d'une différence de potentiel qui, en absence de toute stimulation cellulaire, est appelée potentiel membranaire de repos. Ce potentiel est déterminé par la perméabilité ionique de la membrane cellulaire pour chacun des ions présents. Il est principalement maintenu grâce à la pompe Na/K-ATPase; qui permet la sortie de 3 ions  $\text{Na}^+$  et l'entrée de 2 ions  $\text{K}^+$ , et d'un courant potassique rectifiant entrant. Dans les conditions de repos (diastole), la membrane des cardiomyocytes est donc nettement plus perméable aux ions potassiums. La valeur du potentiel membranaire de repos est proche de la pile à l'équilibre de l'ion

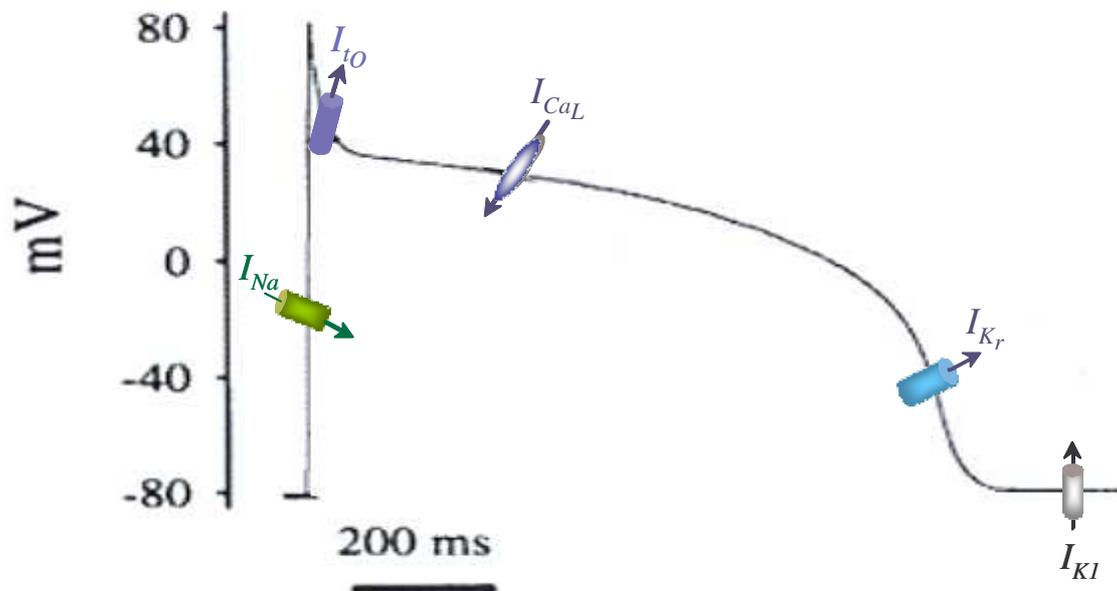
potassium. Chez la truite arc-en-ciel le potentiel de repos est d'environ -75 mV (Nurmi et Vornanen, 2002).

### **3- Le potentiel d'action**

La contraction des cardiomyocytes ventriculaires est la conséquence d'une variation transitoire du potentiel de membrane. Cette variation transitoire, appelée potentiel d'action (PA), résulte de variations de perméabilités ioniques transmembranaires essentiellement sodiques, calciques et potassiques. Différentes phases successives du PA peuvent être identifiées. Chaque phase est générée par une ou plusieurs conductances dominantes (Figure 7).

- La phase 0 ou phase de dépolarisation rapide correspond à une augmentation de la perméabilité sodique membranaire induite par l'ouverture de canaux sodiques dépendant du voltage.
- La phase 1 ou phase de repolarisation rapide est induite par l'activation d'un courant transitoire sortant de nature potassique (pas encore caractérisé chez le poisson).
- La phase 2 ou phase plateau du PA correspond à l'activation d'un courant calcique permettant l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte.
- La phase 3 est un phase de repolarisation induite par un courant potassique sortant.
- La phase 4 est une phase stable où le potentiel de membrane conserve sa valeur de repos. Cette phase correspond à la diastole ventriculaire.

A ces courants dynamiques, s'ajoutent des courants résultant de l'activité des échangeurs et pompes ioniques comme la pompe Na/K-ATPase, l'échangeur Na/Ca ou encore la pompe calcium ATPase.

**Figure 7**

Potentiel d'action ventriculaire de truite arc-en-ciel acclimatée à 17° C. Les différentes conductances impliquées dans les différentes phases du potentiel d'action sont représentées par des flèches. Les flèches orientées vers le haut représentent les courants sortants et celles vers le bas les courants entrants.  $I_{Na}$  représente le courant sodique,  $I_{tO}$  le courant transitoire sortant,  $I_{CaL}$  le courant calcique de type L,  $I_{Kr}$  le courant potassique retardé à cinétique rapide et  $I_{KI}$  le courant potassique participant au maintien du potentiel de repos. Modifié d'après Vornanen et al. (2002a).

#### **4- Les courants ioniques transmembranaires**

##### **a- Le courant sodique ( $I_{Na}$ ):**

###### Caractéristiques électrophysiologiques:

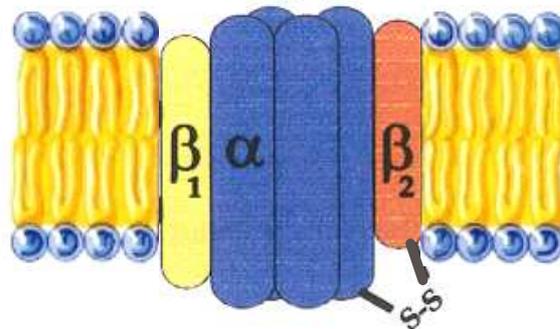
Dans les myocytes ventriculaires de poissons, le courant sodique est un courant qui possède des caractéristiques qui varient sensiblement en fonction de la température d'études et de l'espèce (Haverinen et Vornanen, 2004): Son seuil d'activation est compris entre -70 et -60 mV. Le courant est maximal pour un potentiel de -20 mV et son potentiel d'inversion se situe entre 30 et 40 mV pour des conditions physiologiques normales (150 mM  $Na^+$  externe). Chez la truite arc-en-ciel, la conductance sodique est très largement influencée par la température. Elle est de l'ordre de 0,49 pS/pF à 4°C contre 0,78 pS/pF à 18°C (Haverinen et Vornanen, 2004). La demi activation se situe à un potentiel compris entre -30 et -40 mV. Tandis que la demi inactivation est comprise entre des potentiels de -80 à -100 mV.

Le courant sodique des poissons est inhibé spécifiquement par de faibles concentrations (de l'ordre de 1  $\mu$ M) de tétrodotoxine (TTX).

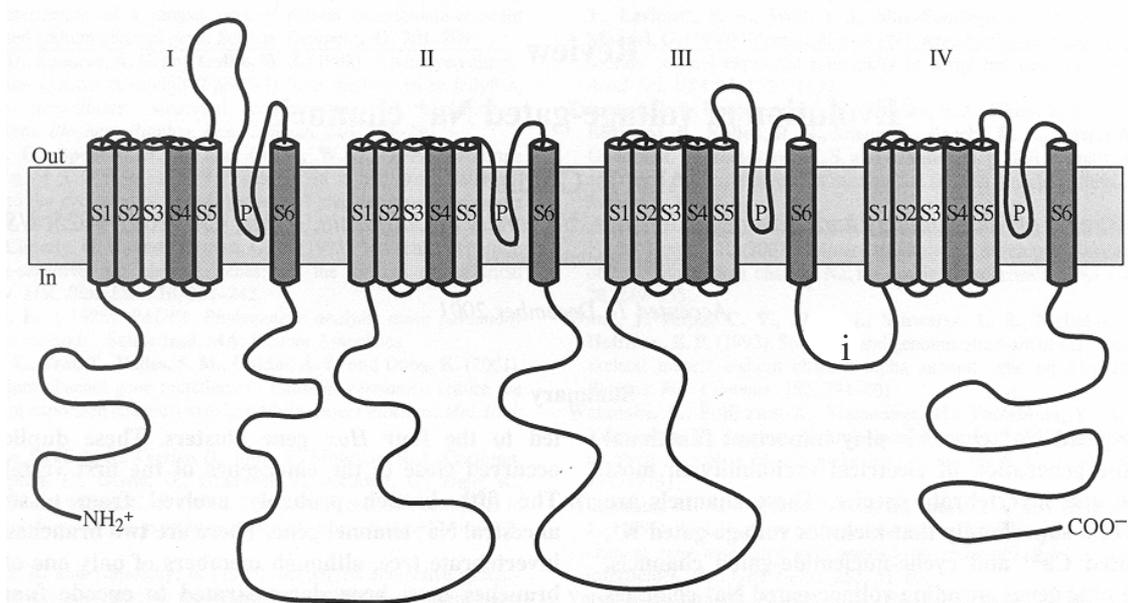
###### Structure moléculaire:

Le canal sodique est formé par (Figure 8):

- une sous-unité  $\alpha$  présentant quatre domaines homologues comprenant chacun six domaines transmembranaires sous forme d'hélice  $\alpha$ . C'est le segment  $S_4$  de chaque domaine homologue, appelé « voltage sensor », qui confère au canal sa sensibilité au voltage. Cette sous-unité présente une forte homologie avec celle du canal calcique. Le pore du canal est formé par les boucles entre les segments  $S_5$  et  $S_6$ .
- deux sous-unités  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Elles permettent de moduler l'activité du canal sodique en jouant notamment sur la conductance et les cinétiques d'activation et d'inactivation du courant (Marban et al., 1998).

**Figure 8.**

- A.** Structure moléculaire du canal sodique. Le canal sodique est composé de trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ). La sous-unité  $\alpha$  forme le canal proprement dit (modifié d'après Heinemann et al., 1994).



- B.** Cartographie fonctionnelle de la sous-unité  $\alpha$ . La région sensible au voltage correspond au segment S4. Les régions « P », formant des épingles à cheveux, constituent la partie externe du pore du canal. La région « i » joue un rôle important dans l'inactivation du canal. D'après Goldin (2002).

Rôle physiologique:

Pendant la phase ascendante du PA ventriculaire, l'activation des canaux sodiques permet une entrée rapide et massive de sodium dans les cellules. Il en résulte une dépolarisation membranaire responsable de la phase 1 du PA. Ce canal va donc permettre l'initiation d'un PA qui va se propager dans l'ensemble du ventricule et provoquer une contraction ventriculaire.

**b- Le courant calcique ( $I_{Ca}$ ):**

Plusieurs canaux calciques ont été identifiés chez le mammifère. Les canaux calciques de types L, P/Q, N, R, et T (Figure 9)

Sur les cellules cardiaques, il existe deux types de canaux calciques: les canaux calciques de type T et les canaux calciques de type L.

- Le courant calcique de type T ( $I_{Ca,T}$ ):

C'est un courant calcique transitoire à bas seuil d'activation. Ses principales propriétés sont (Vassort et Alvarez, 1994; pour revue): un seuil d'activation entre -70 et -60 mV, un pic de courant atteint pour un potentiel de -30 mV et un potentiel d'inversion entre 10 et 60 mV. Il a été mis en évidence dans différents types cellulaires et notamment dans les cellules du sinus veineux de grenouille (Bois et Lenfant, 1991) et celles du nœud sino-atrial de lapin (Hagiwara et al., 1988). Il fut également mis en évidence dans les cellules de Purkinje de chien (Hirano et al., 1989; Zhou et January, 1998). Ce courant est impliqué dans l'activité pacemaker des cellules sinusales et serait à l'origine du dernier tiers de la phase de dépolarisation diastolique.

Les canaux calciques de type T se caractérisent par leur faible sensibilité (par comparaison aux canaux calciques de type L) aux agents pharmacologiques et aux neurotransmetteurs. La kurtoxine (toxine peptidique) serait le seul inhibiteur connu spécifique du courant calcique de type T.

- Le courant calcique de type L ( $I_{Ca,L}$ ):

Ce courant est le courant calcique prédominant dans les tissus ventriculaires des mammifères et des poissons.

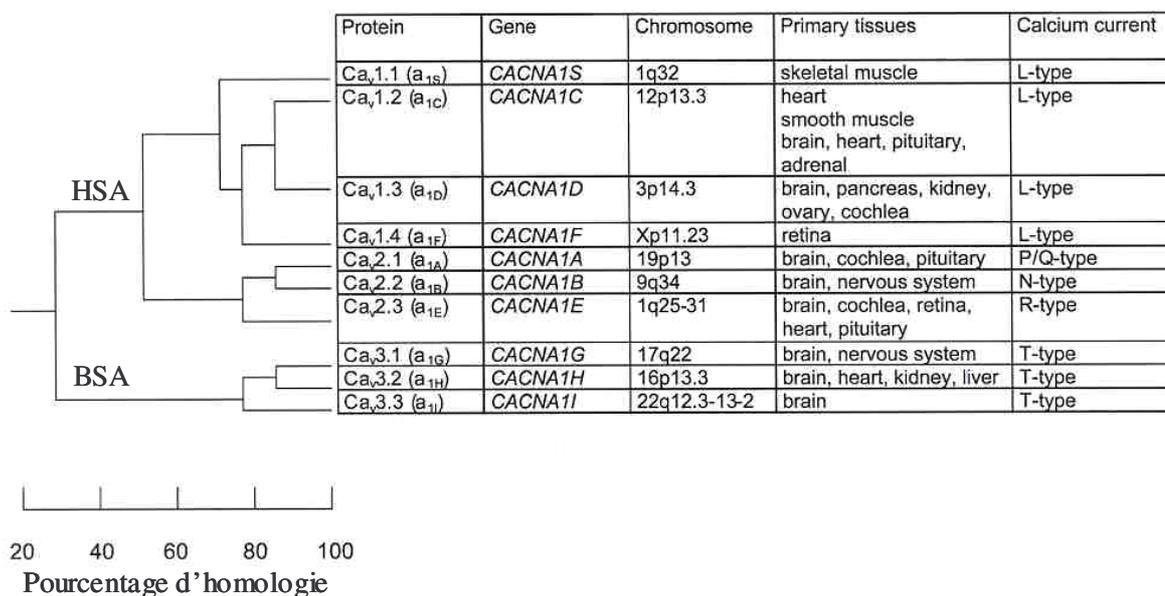
**Figure 9**

Tableau regroupant les différents types de canaux calciques. HSA = canaux à Haut Seuil d'Activation, BSA = canaux à Bas Seuil d'Activation. (modifié d'après Ertel et al., 2000).

Caractéristiques électrophysiologiques:

Son seuil d'activation est plus élevé que celui de  $I_{Ca,T}$  et se situe entre -20 et -40 mV (Vornanen, 1997; Shiels et al., 2004; Kim et al., 2000) selon les espèces considérées. Chez la carpe il est compris entre -40 et -30 mV tandis qu'il se situe aux alentours de -20 mV chez la truite arc-en-ciel. De la même manière, son intensité maximale est atteinte pour des potentiels relativement variables compris entre 0 et +10 mV. Cette intensité maximale dépend fortement de la température. Par exemple pour la truite arc-en-ciel (Shiels et al., 2000) l'intensité maximale est respectivement de -205, -127 et -72 pA, pour des températures de 21, 14 et 7°C (Figure 10). Chez cette même espèce, la demi activation du courant se situe aux alentours de -10 à -5 mV tandis que la demi inactivation est proche de 20 mV (Vornanen, 1998; Shiels et al., 2000). La cinétique d'inactivation de  $I_{Ca,L}$  est décrite par une double exponentielle comprenant une composante rapide (17-60 ms) et une composante lente (93-543 ms). Ces deux composantes sont influencées par la température expérimentale (Shiels et al., 2000). L'inactivation de  $I_{Ca,L}$  est dépendante à la fois de la concentration de calcium libre intracellulaire et du voltage.

Sa dépendance au calcium a été mise en évidence à partir des observations expérimentales suivantes:

L'inactivation est accélérée:

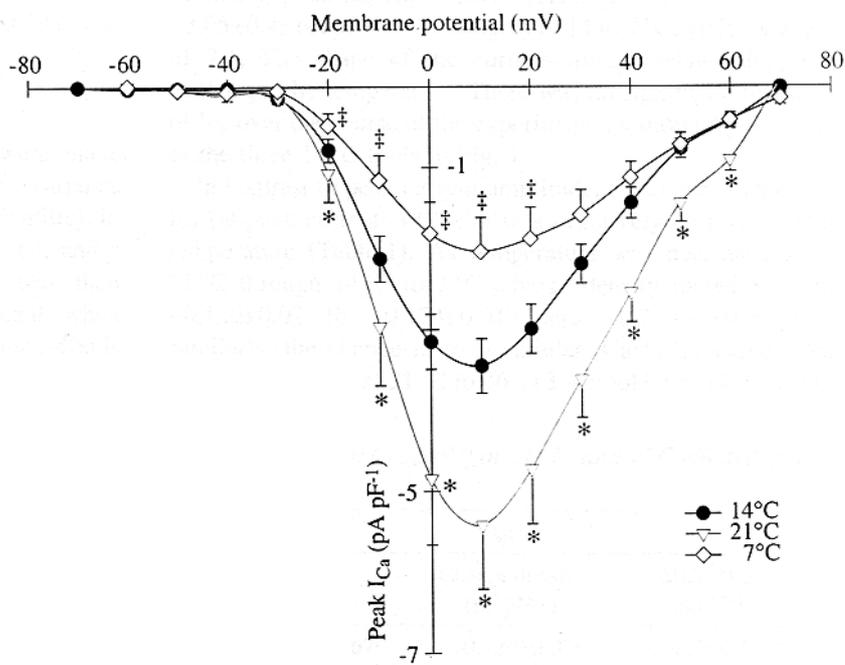
- en augmentant la concentration calcique extracellulaire (Lee et al., 1985)
- en élevant la concentration calcique intracellulaire (Isenberg, 1977)
- si la densité du courant calcique est plus élevée (Argibay et al., 1988)

L'inactivation est ralentie:

- lorsque les ions calcium extracellulaires sont substitués par des cations comme le  $Ba^{2+}$  ou le  $Sr^{2+}$  (Mitchell et al., 1983; Josephson et al., 1984).
- lorsque le calcium intracellulaire est tamponné par des chélateurs tels que l'EGTA ou l'acide 1, 2-bis (2-aminophenoxy) éthane-N,N,N',N'-tétraacétique (BAPTA) (Josephson et al., 1984; Argibay et al., 1988).

Sa dépendance au voltage a pu être démontrée pour les raisons suivantes:

- le courant s'inactive également lorsqu'il est porté par d'autres ions divalents comme le  $Ba^{2+}$  ou le  $Sr^{2+}$  (Kass et sanguinetti, 1984; Lee et al., 1985).

**Figure 10.**

Relation entre l'amplitude du courant et le potentiel imposé (relation courant-potential) pour le courant calcique de type L obtenue à partir de cardiomyocytes auriculaires de truites arc-en-ciel acclimatées à 21, 14 et 7°C. \* indique une différence significative entre 14 et 21°C. ‡ indique une différence significative entre 7 et 14°C. D'après Shiels et al., 2000.

L'inactivation est toujours observée même après des pré-pulses en dessous du seuil d'activation du courant global ou unitaire (Cavalié et al., 1983; Reuter et al., 1982). Ce double mécanisme de contrôle de l'inactivation se traduit par une inactivation principalement dépendante du calcium pour un courant calcique induit par une dépolarisation modérée, alors que pour un courant induit par une forte dépolarisation l'inactivation est gouvernée principalement par les variations de potentiel (Hadley et Hume, 1987).

#### Caractéristiques pharmacologiques:

Une grande variété de molécules chimiques peut moduler les canaux calciques de type L. Ces substances peuvent exercer un effet inhibiteur (antagoniste) ou activateurs (agoniste).

##### *Antagonistes:*

$I_{Ca,L}$  est sélectivement bloqué par des composés inorganiques selon la séquence d'efficacité décroissante suivante:  $La^{3+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$ . L'inhibition résulte d'une compétition entre le bloqueur et le transporteur de charges pour un site de fixation situé sur le canal.

$I_{Ca,L}$  peut également être bloqué par des inhibiteurs organiques. Ces inhibiteurs agissent sur un site défini du canal calcique. Ils sont actuellement classés selon trois grandes catégories (Mori et al., 1996)

- le groupe des dihydropyridines (DHP) qui est le plus important, présente comme molécule phare la nifédipine. De nombreux dérivés ont été développés comme l'isradipine, la nicardipine ou la niguldipine. La plupart des DHP sont électriquement neutres au pH physiologique et atteignent leur site de fixation par voie hydrophobe sans que le canal ait besoin d'être ouvert.
- le groupe des phénylalkylamines qui comprend le vérapamil et ses dérivés.
- le groupe des benzothiazépines qui comprend principalement le diltiazem.

##### *Agonistes:*

Certaines DHP agissent comme activateur du canal calcique. Le plus connu est le Bay K 8644. Il induit une augmentation de l'amplitude du courant et un déplacement vers des potentiels négatifs des courbes d'activation et d'inactivation. D'autres activateurs ont

été identifiés, comme le CGP 28392 et le benzoylpyrol (FPL 64176). Ce dernier est caractérisé comme étant l'activateur le plus puissant (Rampe et Kane, 1994). Il agit sur un site distinct de celui des DHP et ralentit les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal en augmentant sa probabilité d'ouverture.

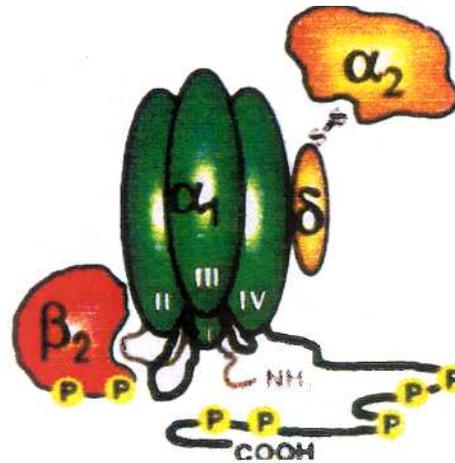
Structure moléculaire:

Chez les poissons téléostéens, la structure du canal calcique de type L est proche de celle des mammifères. Une grande homologie existe entre les différentes sous-unités qui le composent (figure 11).

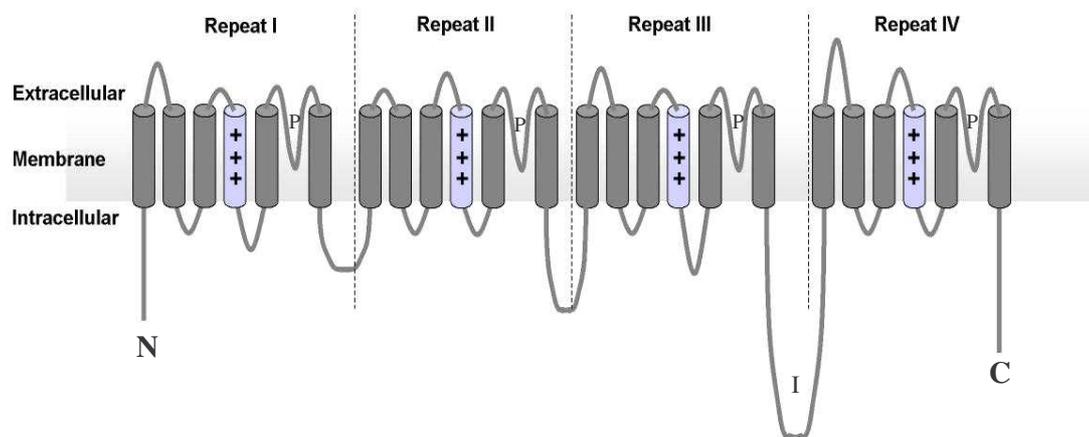
*La sous-unité  $\alpha_1$ :* c'est une sous unité de 190 KDa chez la truite arc-en-ciel contre 243 KDa chez les mammifères. Elle est organisée en quatre domaines répétés. Chaque domaine contient cinq segments hydrophobes (S1, S2, S3, S5, S6) et un segment chargé positivement (S4). Ils sont tous transmembranaires et organisés en hélice  $\alpha$ . Le segment S4 correspond au site sensible au potentiel. Cette sous-unité porte le site de fixation des DHP, des phénylalkylamines et des benzothiazépines. Elle présente au niveau de sa face intracytoplasmique, en relation avec la sous-unité  $\beta$ , le site responsable de l'inactivation de type « calcium-dépendante » (Zong et al., 1994). Le site impliqué dans l'inactivation de type « voltage-dépendante » (Zong et al., 1994) est situé au niveau du segment S6 du motif 1. Elle est phosphorylée *in vivo* par la protéine kinase A, la protéine kinase « calcium-calmoduline-dépendante » et la protéine kinase C.

*La sous-unité  $\alpha_2$  et  $\delta$ :* ces deux sous-unités forment un dimère chez le mammifère. La sous-unité  $\alpha_2$  est plus importante chez le poisson que chez le mammifère (respectivement 220 KDa contre 150 KDa; Tibbits et al., 1992). La sous-unité  $\alpha_2$  est une protéine membranaire périphérique, organisée en deux segments possédant de nombreux sites de glycosylation et de phosphorylation. La sous-unité  $\delta$ , formée par un seul segment transmembranaire, interviendrait pour stabiliser  $\alpha_2$  dans la membrane.

*La sous-unité  $\beta$ :* chez le mammifère c'est une protéine cytoplasmique hydrophile associée à  $\alpha_1$  qui ne possède aucun segment transmembranaire. Elle est organisée en quatre domaines majeurs arrangés en hélice  $\alpha$ . Elle possède de nombreux sites de phosphorylation mais aucun site de glycosylation. Elle contrôle le fonctionnement du canal en accélérant sa

**Figure 11.**

- A.** Représentation schématique de la structure en 4 sous-unités du canal calcique de type L du muscle cardiaque. (D'après Hosey et al., 1996).



- B.** Cartographie fonctionnelle de la sous-unité  $\alpha$  du canal calcique de type L. La région sensible au voltage correspond au segment S4 chargé positivement (+). Les régions « P », formant des épines à cheveux, constituent la partie externe du pore du canal. La région « I » joue un rôle important dans l'inactivation du canal.

cinétique. Un peptide de 50-58 KDa a été isolé chez la truite et pourrait correspondre à cette sous-unité (Tibbits et al. 1992).

*La sous-unité  $\gamma$* : Un peptide de 30 KDa isolé chez la truite pourrait correspondre à cette sous-unité (Tibbits et al., 1992).

### Rôle physiologique:

Le courant de type L joue un rôle prépondérant dans l'excitabilité de la cellule cardiaque et dans le travail cardiaque. Il constitue la voie d'entrée principale du calcium lors d'une dépolarisation membranaire. Il joue un rôle très important dans le maintien du plateau du PA ventriculaire et, par conséquent, détermine la durée du PA. Dans les mécanismes de couplage excitation-contraction, l'influx massif de calcium par ces canaux induit une augmentation de calcium intra-cytosolique. Cette élévation peut soit activer directement la contraction, soit induire une libération de calcium des sites de stockage intracellulaires (phénomène appelé libération de calcium induite par le calcium: « calcium induced calcium release », CICR) du réticulum sarcoplasmique, pour atteindre la concentration nécessaire à l'induction du processus contractile.

### **c- Les courant potassiques:**

Différents types de courants potassiques ont été mis en évidence dans le cœur de poisson:

- Le courant sortant transitoire ( $I_{to}$ )

Ce courant n'a pas encore été caractérisé chez les poissons. Chez le mammifère, il est composé de deux courants distincts, qui peuvent être différenciés par leurs propriétés cinétiques, pharmacologiques et d'activation par le calcium intracellulaire (Coraboeuf et Carmeliet, 1982).

La première composante appelée  $I_{bo}$  pour « brief outward », est définie comme un courant potassique dépendant du calcium intracellulaire ( $I_{K-Ca}$ ). Ce courant est supprimé par les antagonistes calciques, lors du remplacement du calcium par le strontium ou encore par l'addition de caféine. Son seuil d'activation se situe entre -30 et -20 mV, il est maximal pour des potentiels compris entre +30 et +70 mV. Il interviendrait comme mécanisme de

« feed-back » vis-à-vis de l'influx calcique en diminuant la phase de dépolarisation du PA. Il diminuerait ainsi l'activation du courant calcique.

La seconde composante appelée  $I_{lo}$  pour « long-lasting » ne dépend que de la dépolarisation membranaire. Ce courant est totalement indépendant du calcium intracellulaire. Son seuil d'activation se situe entre -30 et -20 mV. Ce courant est inhibé par la 4-amino pyridine et par les ions  $Ba^{2+}$  et  $Cs^+$ .

- Le courant potassique sortant retardé:

Ce courant est impliqué dans la phase de repolarisation du PA cardiaque. Dans le cœur de mammifère, deux types de courants potassiques retardés ont été identifiés selon leurs caractéristiques biophysiques et pharmacologiques (Mitcheson et Sanguinetti, 1999). On distingue les courants:

- $I_{Kr}$ : de type rapide, activé par des dépolarisations de courte durée et de faible amplitude. Sa cinétique est relativement rapide car il s'inactive spontanément pour des dépolarisations prolongées. Il est inhibé par les ions lanthanés ( $La^{3+}$ ) et par la drogue anti-arythmique E-4031.

- $I_{Ks}$ : de type lent « slow » activé par des dépolarisations de longue durée et de forte amplitude. Il est insensible aux inhibiteurs affectant  $I_{Kr}$ .

Chez la truite arc-en-ciel, le courant potassique des myocytes auriculaires et ventriculaires est principalement porté par la composante rapide  $I_{Kr}$  (Vornanen et al., 2002a).

- Le courant  $I_{K1}$ :

Chez le mammifère comme chez le poisson, ce courant est plus fortement exprimé dans le tissu ventriculaire par rapport au tissu auriculaire (Giles et Imaizumi, 1988; Hume et Uehara, 1985; Vornanen et Tuomennoro, 1999). Il peut être activé en hyperpolarisation. Son activation est dépendante du voltage et son inactivation est à la fois dépendante du voltage et du temps. Il permet le maintien d'un potentiel de repos stable et contribue à la phase de repolarisation finale du PA (Snyders, 1999).

- Le courant potassique sensible à l'adénosine triphosphate ( $I_{K-ATP}$ ):

Ce canal a été caractérisé dans le cœur de différentes espèces de poissons (Ganim et al., 1998; MacCormack et Driedzic, 2002; Paajanen et Vornanen, 2002). Les courants  $I_{K-ATP}$  sont activés par une diminution du ratio ATP/ADP intracellulaire. L'ouverture du canal va provoquer une sortie de potassium de la cellule ce qui va avoir pour conséquence de diminuer la durée du PA. Ce canal n'est activé que lorsque la production d'ATP est perturbée comme lors d'une hypoxie.

#### **d- Les autres systèmes de transports ioniques**

- La pompe sodium potassium (Na/K-ATPase)

La pompe Na/K-ATPase représente un des systèmes de transport les plus importants de la membrane plasmique dans les conditions de repos. Elle permet le transport actif des ions  $Na^+$  et  $K^+$ . En rétablissant les concentrations de ces ions de part et d'autre de la membrane plasmique, elle favorise la stabilité du potentiel de membrane de repos. Durant chaque cycle, pour une molécule d'ATP hydrolysée, la pompe favorise la sortie de trois ions  $Na^+$  et l'entrée de deux ions  $K^+$ . Elle entraîne ainsi un mouvement net sortant de charges positives et est donc électrogénique. Les inhibiteurs font partie de la classe des glycosides cardiotoniques comme la ouabaïne (Eisner et Smith, 1992).

#### L'échangeur sodium-calcium (NCX)

Le NCX est un système particulier permettant le contrôle de l'homéostasie calcique et sodique en utilisant le gradient de concentration de chaque ion. C'est l'entrée de trois ions sodium dans la cellule selon un gradient électrochimique favorable qui fournit l'énergie nécessaire au transport d'un ion calcium. L'échange est par ailleurs réversible et peut permettre l'entrée du calcium dans la cellule en échange du sodium sortant. Ce fonctionnement en mode inverse a lieu lorsque la cellule est dépolarisée et proche du pic du PA. En effet, le potentiel d'inversion du NCX est de l'ordre de -40 à -20 mV chez les mammifères (Bers, 1987) et est plus élevé chez les poissons où il serait proche de « l'overshoot » du PA (Fiolet et Baartscheer, 2000). Cet échangeur a été caractérisé structurellement chez la truite arc-en-ciel et possède environ 75 % d'homologie de séquence avec le NCX1 des mammifères (Xue et al., 1999).

- L'échangeur sodium/proton

Il échange un ion  $\text{Na}^+$  contre un ion  $\text{H}^+$  au niveau de la membrane plasmique. Ce serait un mécanisme de régulation du pH intracellulaire. En effet, en cas de diminution du pH intracellulaire, il extrude les protons en faisant entrer des ions sodium dans la cellule et permet ainsi de limiter l'acidose intracellulaire et de contrôler le sodium intracellulaire (Lazdunski et al., 1985). Les inhibiteurs les plus connus sont l'amiloride et ses analogues.

- La pompe calcium ATPase du sarcolemme (PMCA)

Ce transporteur calcique est activé par une élévation de la concentration calcique intracellulaire (Katz, 1997). Elle possède un site sensible à la calmoduline qui va directement stimuler la PMCA. Cette pompe permet l'extrusion d'un ion calcium de la cellule en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP intracellulaire (Carafoli, 1992). Les acides gras poly-insaturés ainsi que la phosphorylation de la PMCA par la protéine kinase C vont augmenter son activité ATPasique (Carafoli, 1992).

## **C. Homéostasie calcique et phénomène de contraction**

### **1- Homéostasie calcique**

Au repos, il existe une grande disparité entre les concentrations calciques intracellulaires et extracellulaires. En effet, la concentration intracellulaire est de l'ordre de  $0,1 \mu\text{M}$  (Vornanen et al., 2002b) soit dix mille fois moins que dans le milieu extracellulaire (Katz, 1992). Le maintien de ce différentiel de concentration calcique est indispensable à la survie des cellules. Dans les cardiomyocytes, de nombreux mécanismes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie calcique au repos:

- le NCX va permettre, en mode de fonctionnement normal, la sortie des ions calcium de la cellule et l'entrée d'ions sodium pour des potentiels inférieurs au potentiel d'inversion (estimé à  $-30 \text{ mV}$ ). Il fonctionnera dans le mode inverse pour des potentiels supérieurs à  $-30 \text{ mV}$ .
- la PMCA du sarcolemme va faire sortir activement le calcium de la cellule

- le réticulum sarcoplasmique (RS): c'est un organite intra cytoplasmique permettant le stockage du calcium. Le calcium va entrer dans le RS grâce à la présence dans sa membrane de pompes calcium ATPase spécifiques (SERCA). La structure moléculaire de ces pompes n'a pas encore été caractérisée chez les poissons. Chez les mammifères il apparaît que la structure moléculaire et le mode de régulation de cette pompe diffèrent de ceux de la PMCA de la membrane plasmique (Bers, 1987). La SERCA est régulée par une protéine transmembranaire du RS appelée phospholamban (PLB). La phosphorylation du PLB, par des protéines kinases activées par l'AMPc intracellulaire ou le complexe calcium/calmoduline, augmente l'affinité de la SERCA pour le calcium. Il en résulte une augmentation du calcium transporté par la SERCA dans le RS (Simmerman et Jones, 1998). Elle permet ainsi une entrée active du calcium cytoplasmique dans le RS.

Le RS possède également des canaux calciques sensibles à la ryanodine. Ces canaux ne sont pas dépendants du voltage mais sont dépendants du calcium. En effet, ils sont activés par une augmentation de calcium intracellulaire (CICR). L'activation de ces canaux provoque une libération du calcium stocké dans le RS. Un autre type de canal calcique existe dans la membrane du RS. C'est un canal activé par l'inositol triphosphate (IP3) libéré suite au clivage des phosphoinositides membranaires par la phospholipase C. Toutefois, ce canal n'a pas encore été caractérisé chez le poisson.

- les calcium-binding protein (CaBP): ce sont des protéines présentes dans le cytoplasme et le RS qui vont permettre de tamponner les ions calcium par chélation. Parmi ces CaBP, la troponine C (Yang et al., 2000, Gillis et al., 2000) et la calmoduline (Katz, 1997) ont été particulièrement étudiées.
- les mitochondries: elles sont le siège du métabolisme oxydatif. Bien que leur importance dans la régulation du calcium intracellulaire ne soit pas encore définie précisément, elles sont capables de stocker des quantités importantes de calcium chez les mammifères (Duchen, 2000).
- le noyau cellulaire: il est capable de stocker le calcium lors d'une augmentation de calcium cytosolique (Allbritton et al., 1994). Cette capacité à stocker le calcium pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie calcique (Anderson, 2000).

## **2- Le couplage excitation-contraction**

### **a- Le système contractile**

- Les myofibrilles

Elles sont constituées de myofilaments qui représentent environ 40% du volume cellulaire (Santer, 1985). Dans les myofibrilles, les myofilaments sont disposés parallèlement à leur axe longitudinal. Il en existe deux sortes:

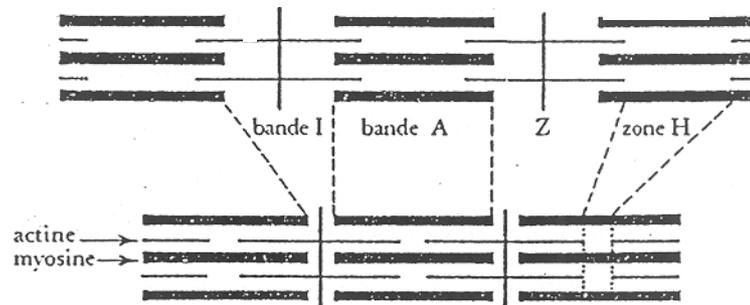
- les myofilaments épais de myosine forment une bande sombre (A).
- les myofilaments fins d'actine forment une bande claire (I).

Ces bandes alignées par rapport à celles de la myofibrille voisine donnent à la cellule musculaire cardiaque son aspect strié. La bande I est traversée par le disque Z, deux disques Z délimitent un sarcomère. La bande A comprend en son centre la bande H ne contenant pas d'actine. La bande H varie selon le degré de contraction. La contraction cardiaque résulte du glissement des filaments fins d'actine par rapport aux filaments épais de myosine, la longueur de chaque type de filaments restant constante (Figure 12.A) (Huxley, 1969).

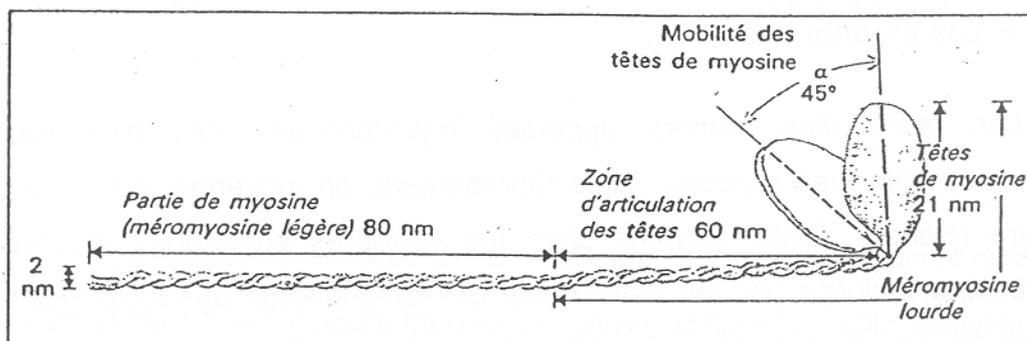
- Les protéines contractiles

La myosine: cette protéine est constituée de deux chaînes lourdes (MHC) polypeptidiques qui au niveau de leur extrémité C terminale s'enroulent pour former un bâtonnet (Figure 12.B). Chacune de ces chaînes lourdes se sépare en son extrémité N terminale pour se combiner à quatre chaînes légères (MLC) et former la tête de la molécule. Ces têtes globulaires possèdent des sites de fixation des molécules d'ATP et ont une activité ATPasique qui dépend du degré d'évolution de l'espèce et du tissu concerné (Aho et Vornanen, 1999). Ces têtes possèdent également des sites d'interaction avec les molécules d'actines. L'activité ATPasique de la myosine est corrélée avec la vitesse de raccourcissement du muscle.

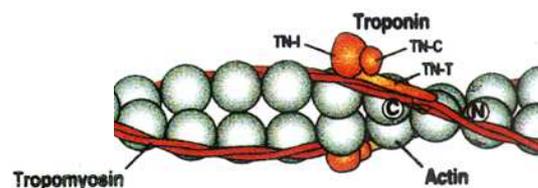
L'actine: elle est composée de deux filaments hélicoïdaux d'actine polymérisées et d'un ensemble de protéines régulatrices (Figure 12.C). Celles-ci sont la tropomyosine et les troponines (Katz, 1992).

**Figure 12**

- A.** Représentation schématique du raccourcissement des sarcomères pendant la contraction cellulaire.



- B.** Schéma d'une molécule de myosine comprenant deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères.



- C.** Structure d'un filament fin comprenant l'actine, la tropomyosine et différentes troponines (TN-C, TN-T, TN-I). Modifié d'après Gregorio et Fowler (1996).

Lors d'une augmentation de calcium intracellulaire, les ions calcium se fixent sur la troponine C ce qui modifie la conformation de la tropomyosine. Ceci permet de libérer les sites de fixations spécifiques de la myosine présents sur la molécule d'actine. Dans le même temps, la fixation du calcium sur la troponine C permet la levée de l'inhibition exercée par la troponine I sur l'activité ATPasique de la tête de myosine. Il va alors y avoir hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP + Pi (phosphate inorganique) ce qui aboutit à la formation d'un complexe actine-myosine-ADP-Pi. Lorsque le Pi et l'ADP se détachent de ce complexe, ceci permet une modification de l'angle formé par les têtes de myosine fixées à l'actine. Il en résulte un glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosines induisant le raccourcissement des sarcomères et traduisant ainsi le phénomène contractile. Ce complexe actine-myosine reste stable. Seul la présence d'une nouvelle molécule d'ATP permet la rupture de la liaison entre l'actine et la myosine et ainsi la relaxation musculaire.

#### **b- Le mécanisme de couplage excitation-contraction**

Le mécanisme de couplage excitation-contraction (CEC) peut être considéré comme le mécanisme de transduction entre l'excitation électrique de la membrane et une réponse contractile induite par une augmentation de calcium intracellulaire. La séquence d'évènement se produisant lors du CEC dépend étroitement du type cellulaire concerné et du degré d'évolution de l'espèce. Chez les mammifères, il est considéré comme étant le plus efficace et le plus évolué par rapport aux vertébrés inférieurs tels que les poissons. Chez les poissons, le CEC a été beaucoup moins étudié que chez les mammifères. Il serait relativement variable en fonction de la température et de l'espèce considérée (Vornanen et al., 2002b). La dépolarisation membranaire permet l'activation de  $I_{Ca,L}$  et le fonctionnement du NCX en mode inverse. Ceci a pour conséquence une entrée massive de calcium dans la cellule. Cette augmentation de calcium intracellulaire va provoquer chez les mammifères le phénomène de CICR induisant une libération de calcium à partir des stocks du RS. Ceci a pour effet d'accroître l'augmentation de calcium cytosolique. Chez les poissons, il semblerait que les canaux calciques de type L sont principalement responsables de l'augmentation de calcium intracellulaire (Vornanen, 1997; Coyne et al., 2000, Thomas et al., 1996). Le calcium se fixe alors sur la Tn-C et permet la contraction des myofibrilles. Pendant la diastole, le calcium cytosolique est extrudé de la cellule *via* les pompes PMCA et l'échangeur NCX fonctionnant en mode normal. Le calcium est

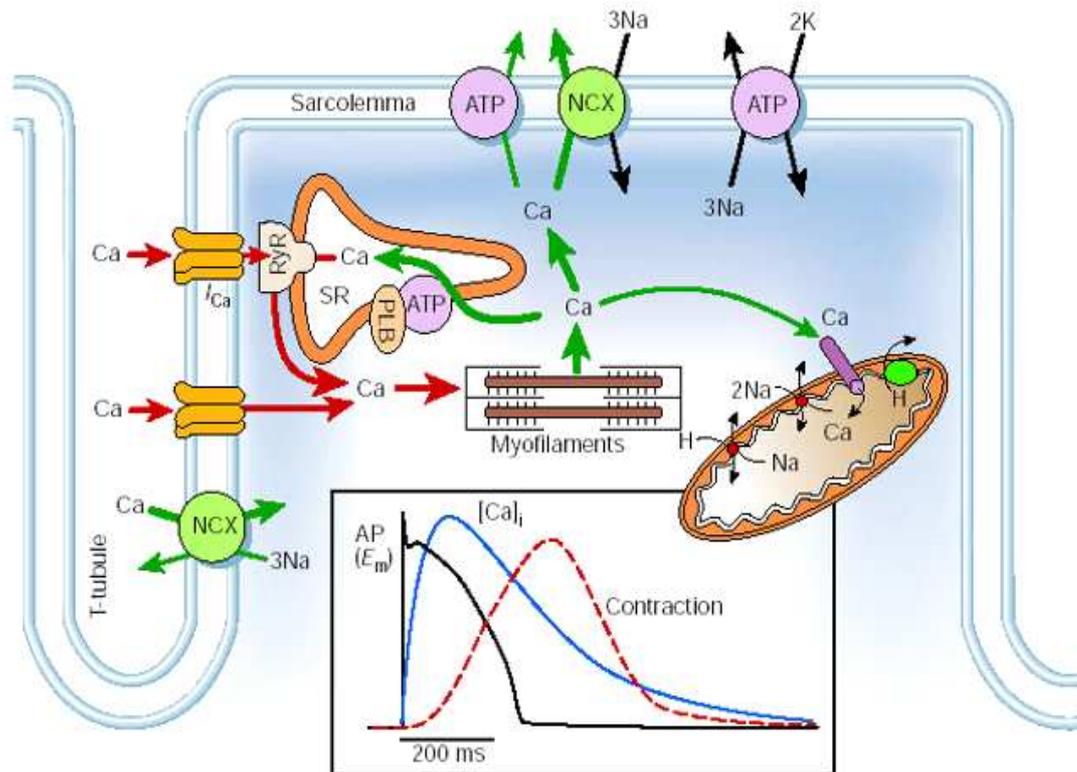
---

également récupéré dans ses différents stocks intracellulaires comme le RS par les pompes SERCA ou encore les mitochondries (Pietrobon et al., 1990; Figure 13)

## **D. Surcharge calcique et arythmies cardiaques**

Comme décrit précédemment, le calcium est un ion fondamental pour assurer le bon fonctionnement cardiaque. Il permet en effet d'assurer l'efficacité de la contraction cardiaque nécessaire au maintien d'un débit cardiaque suffisant pour transporter les différents éléments ( $O_2$ , nutriments...) nécessaires aux différents organes. Toutefois, des perturbations de l'homéostasie calcique peuvent engendrer des problèmes de fonctionnement et dans les cas les plus extrêmes entraîner la mort cellulaire.

Par exemple, lorsque le niveau d'oxygénation du cytoplasme descend sous un seuil critique, le transport d'électrons et le processus d'éjection des protons de la mitochondrie s'arrêtent (Piper et al., 1994). L'énergie fournie par le gradient de proton devient alors trop faible pour permettre la synthèse d'ATP en quantité suffisante. L'acidification résultante va induire une diminution d'ATP intracellulaire et une augmentation d'ADP intracellulaire (Wasser et al., 1997). Ce dysfonctionnement va perturber le processus de contraction musculaire ainsi que l'activité des transporteurs actifs comme la pompe Na/K ATPase et la PMCA. Ces modifications vont avoir une incidence importante sur les concentrations ioniques des cellules. La baisse de l'activité Na/K ATPasique induira une diminution de la concentration du potassium intracellulaire, qui sera amplifiée par l'activation des courants  $I_{K-ATP}$  dont l'activité augmente lorsque le rapport ATP/ADP diminue. L'inhibition de la pompe Na/K ATPase va également pouvoir provoquer une accumulation de sodium intracellulaire ce qui va conduire à un fonctionnement de l'échangeur NCX en mode inverse, c'est-à-dire faisant sortir trois ions sodium pour l'entrée d'un ion calcium. Le courant sortant résultant va dépolariser la cellule. De plus, les pompes calcium ATPase étant limitées par la diminution d'ATP intracellulaire, elles ne permettront plus une sortie ou un stockage efficace du calcium dans les stocks internes. Par ailleurs, le blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale est de nature à induire une libération des stocks de calcium mitochondriaux (Vornanen et Tuomennoro, 1999). L'accumulation de calcium dans le cytoplasme qui résulte de ces perturbations diminue la phase de plateau du PA en

**Figure 13**

Représentation schématique du couplage excitation-contraction dans un myocyte de mammifère. D'après Bers (2002). RyR représente les canaux sensibles à l ryanodine,  $I_{Ca}$  les canaux calciques, NCX l'échangeur Na/Ca, ATP les différentes pompes ATPasiques, PLB le phospholamban.

inactivant les canaux calciques de type L favorisant ainsi les phénomènes de réentrée. Le raccourcissement du PA permettra en effet l'apparition précoce de nouveaux PA. Une forte augmentation de calcium intracellulaire pourra également activer certaines protéases impliquées dans les processus d'apoptose ou de nécrose observés en ischémie (Hajnoczky et al., 2003). Bien que l'intégralité de l'enchaînement de ces événements n'ait pas été démontrée chez les poissons, plusieurs travaux ont montré que le blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale induisait effectivement un fonctionnement en mode inverse du NCX, une diminution de la phase de plateau du PA ainsi qu'une augmentation du calcium intracellulaire (Vornanen et Tuomennoro, 1999). Ces observations permettent de penser que les mécanismes mis en jeu lors d'une diminution importante d'oxygène intracellulaire pourraient être semblables chez les mammifères et les poissons.

Une augmentation de calcium intracellulaire peut avoir pour conséquence l'activation d'un courant transitoire entrant ( $I_{t_i}$ ). Ce courant serait la résultante de plusieurs mécanismes ioniques activés par une augmentation de calcium intracellulaire. Ces différentes composantes ioniques sont attribuées à:

- l'échangeur NCX (Kass et al., 1978a,b; Yue-jin et Anderson, 2001).
- un courant chlorure dépendant du calcium intracellulaire ( $I_{Cl_{Ca}}$ ) (Laflamme et Becker, 1996).
- un courant cationique non sélectif activé par le calcium ( $I_{NSC_{Ca}}$ ) (Guinamard et al., 2004a et b; Carmeliet, 1999; Yue-Jin et Anderson, 2001).

L'activation de ce courant  $I_{t_i}$  induit une dépolarisation membranaire. Si cette dépolarisation est suffisante, elle pourrait permettre la génération d'un PA supplémentaire. La propagation de ce PA aux autres myocytes va conduire à une contraction cardiaque supplémentaire. La répétition de ce phénomène permet l'entrée du cœur en arythmie.

## **IV- Effets physiologiques des acides gras**

### **A. Effets des acides gras sur le système cardio-respiratoire**

#### **1- Effets sur la composition tissulaire**

La composition tissulaire en Ag va dépendre des apports alimentaires. En effet, de nombreuses études montrent que des changements de la composition en Ag du régime alimentaire s'accompagnent de changements des profils lipidiques tissulaires. Par exemple, des expériences réalisées sur le saumon Atlantique indiquent clairement une relation linéaire entre la concentration d'un acide gras dans les tissus musculaires et sa concentration dans l'alimentation (Bell et al., 2001; 2002). De la même manière, comparé à des esturgeons nourris avec une huile de coco, riche en acides gras saturés, des esturgeons nourris avec une alimentation enrichie en huile de poisson (riche en n-3 PUFA), possèdent un taux élevé de n-3 PUFA (comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA)) dans le foie, les muscles ou encore le cœur (Agnisola et al., 1996; McKenzie et al., 1997). Des résultats similaires ont également été obtenus sur le tissu cardiaque des mammifères (Charnock et al., 1992; Al Makdessi et al., 1995). Bien que la composition en acides gras des tissus reflète la composition en Ag de l'alimentation; différents facteurs peuvent toutefois influencer sur l'intégration des acides gras dans les tissus. En effet, Cordier et al., (2002) ont observé une corrélation significative entre la salinité de l'eau et le taux de 22:6 n-3 (DHA) dans les phospholipides totaux des branchies, du foie et des muscles de bars. Selon ces auteurs, la salinité jouerait un rôle dans la régulation de l'activité de certains enzymes intervenant dans le métabolisme des lipides. Cette modulation de l'activité serait elle-même très dépendante de la température (Zwingelstein et al., 1998a; 1998b). Il a été également suggéré que la salinité contrôlerait les cycles de phosphorylation/déphosphorylation des enzymes agissant sur différentes voies du métabolisme des lipides (Michelsen et al., 1994) dépendamment de la température.

---

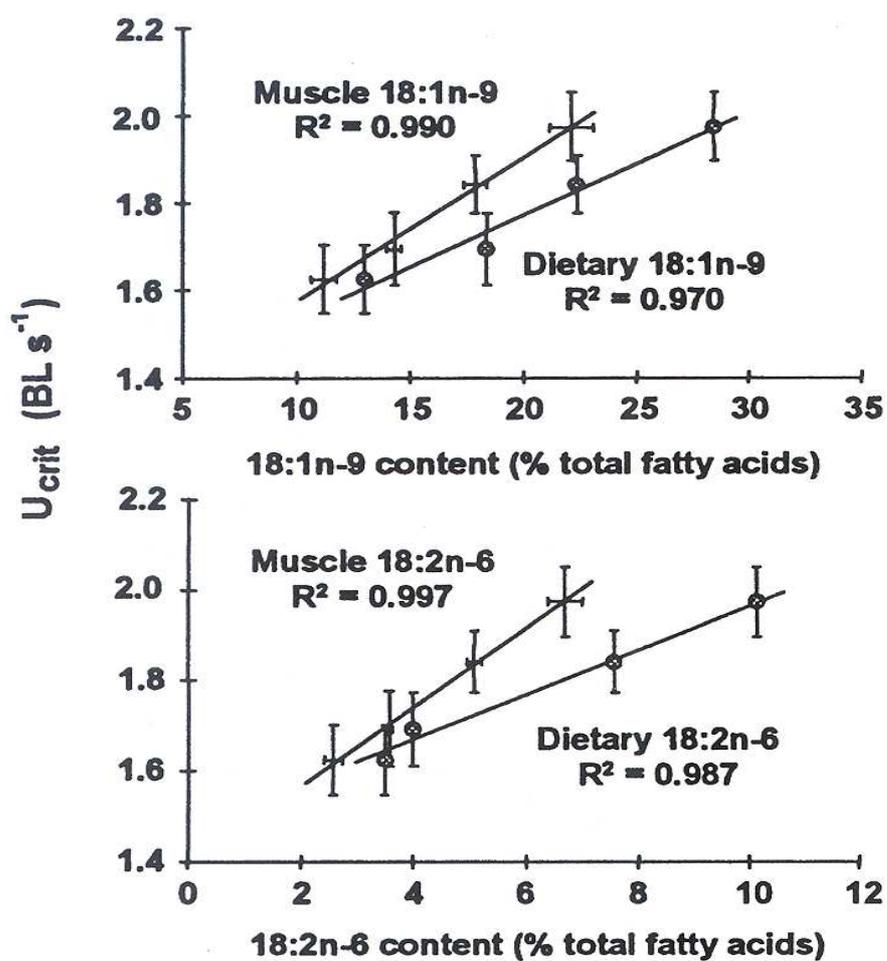
## **2- Effets sur les performances de nage**

Les performances de nage des poissons seraient corrélées significativement avec leur composition tissulaire en Ag. Des expériences réalisées sur le saumon Atlantique, nourris avec une alimentation enrichie avec des proportions différentes d'huile de poisson (riche en n-3 PUFA) et d'huile de colza (riche en acide oléique et linoléique), montrent que les performances locomotrices des poissons varient selon le pourcentage de ces huiles dans l'alimentation. En effet, les poissons nourris avec l'alimentation uniquement enrichie en huile de poissons, possèdent les performances de nage les plus faibles. Inversement, plus la teneur en huile de colza est élevée, plus les performances s'améliorent. De plus, une relation linéaire positive a été mise en évidence entre la vitesse de nage maximale des poissons et le taux musculaire d'acide oléique et linoléique (Figure 14; McKenzie et al., 1998). Ces résultats sont toutefois controversés puisqu'une étude de Wagner et al., (2004) a révélé une relation inverse chez le saumon où des performances de nage supérieures ont été observées avec des poissons nourris avec une alimentation enrichie en n-3 PUFA.

## **3- Effets sur le métabolisme**

A l'heure actuelle, les effets des Ag alimentaires sur le métabolisme ont été relativement peu étudiés chez le poisson. Toutefois, il apparaît que la composition en Ag de l'alimentation a des effets notables sur la consommation d'oxygène d'un organisme et en particulier sur son taux métabolique basal. Des esturgeons et des anguilles nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA voient leur consommation d'oxygène de repos diminuer d'environ 30 % par rapport à des esturgeons alimentés avec un alimentation riche en Ag saturés. Ces effets sur le métabolisme ont également été étudiés en conditions hypoxiques. Si aucun effet de l'hypoxie n'a été observé sur la consommation d'oxygène des esturgeons alimentés avec des n-3 PUFA, celle des poissons alimentés avec des Ag saturés a diminué de façon importante au cours de l'épreuve hypoxique (pour revue: McKenzie, 2001).

En conséquence, il apparaît que les Ag ont un effet significatif sur le métabolisme énergétique des poissons. Les Ag n-3 PUFA induiraient une diminution de la consommation d'oxygène, par rapport à des Ag saturés, protégeant ainsi les poissons dans des conditions de faible disponibilité en oxygène dans l'eau.

**Figure 14**

Relation linéaire positive entre le taux d'acide linoléique (18:2 n-6) et oléique (18:1 n-9), de l'alimentation et des muscles, et la vitesse critique de nage des saumons. D'après McKenzie et al., (2001).

#### **4- Effets cardiaques**

Chez les mammifères, il est bien établi que les Ag ont des effets non négligeables sur la physiologie cardiaque. Les études actuelles, se sont principalement focalisées sur les effets d'alimentations riches en n-3 PUFA comparées à des alimentations riches en Ag saturés. Des expérimentations *in vitro* conduites sur le cœur de rat, ont montré qu'un taux important de n-3 PUFA dans l'alimentation augmentait le débit et le travail cardiaque maximal comparé à des rats nourris avec une alimentation de référence ou enrichie en Ag saturés (Pepe et MacLennan, 2002). Une augmentation de la force de contraction a également été observée dans le cas de cœurs isolés de grenouille suite à la perfusion de sels d'acide oléique et d'acide stéarique (Patel et Verma, 1981). Par ailleurs, des résultats obtenus chez la truite arc-en-ciel ont montré que le cœur isolé d'individu nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA développe une force de contraction et un débit cardiaque plus élevés que les cœurs de poissons nourris avec une alimentation pauvre en n-3 PUFA (Paige et al., 1996). Des effets similaires ont été mis en évidence sur le cœur isolé d'esturgeon. En effet, les esturgeons nourris avec une alimentation enrichie en huile de poisson (riche en n-3 PUFA) ont une puissance cardiaque maximale supérieure à celle mesurée sur les cœurs de poissons nourris avec une alimentation enrichie en huile de coco (riche en Ag saturés). Au cours de cette dernière étude, une fréquence et un travail cardiaque de repos plus faibles ont également été mis en évidence chez les poissons dont le régime était supplémenté en huile de poisson (Agnisola et al., 1996). Ces travaux montrent un effet des Ag sur le degré de tolérance des cœurs à un épisode hypoxique. En effet, les cœurs de rats nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA ont une capacité d'extraction de l'oxygène significativement plus élevée que celle des rats nourris avec des alimentations riches en Ag saturés (Pepe et McLennan, 2002). L'apport en n-3 PUFA protège non seulement le cœur de l'hypoxie, mais favorise également une meilleure récupération du travail cardiaque après celle-ci. (Agnisola et al., 1996; Paige et al., 1996; Pepe et McLennan; 2002).

Globalement, ces résultats permettent de penser que les acides gras ont des mécanismes d'actions similaires sur les cœurs de mammifères et de poissons. Chez les mammifères, la modulation des Ag membranaires, ainsi que l'application directe d'Ag non estérifiés sur les cellules cardiaques, modulent une grande variété de mécanismes intracellulaires et

membranaires. La modification des flux ioniques, de l'activité des transporteurs ioniques ou encore de certaines enzymes intracellulaires pourrait ainsi participer aux différents effets cardiaques des Ag.

## **B. Effets des acides gras sur les cardiomyocytes**

Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études ont été réalisées chez les mammifères afin d'appréhender les effets des Ag sur les myocytes cardiaques. Ces travaux se sont principalement focalisés sur l'influence que pouvaient avoir les Ag sur la genèse d'arythmies. Dans cette optique, les différentes études ont examiné l'influence des Ag non estérifiés sur les courants ioniques transmembranaires, l'homéostasie calcique ainsi que sur la contraction des cardiomyocytes. Si de nombreux travaux ont été réalisés, la plupart de ces études se sont focalisées sur les n-3 PUFA. A l'heure actuelle, aucun effet des Ag sur les cardiomyocytes des poissons n'est connu. Dans ce chapitre, l'ensemble des études présentées traite des acides gras sous leur forme non estérifiée.

### **1- Activité électrique des cardiomyocytes**

Le potentiel d'action des cardiomyocytes est modifié par les Ag comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA; 22:6 n-3). Celui-ci va provoquer une légère hyperpolarisation du potentiel membranaire de repos, une augmentation du seuil d'activation ainsi qu'une augmentation de la période réfractaire du PA (Kang et al., 1995). Ces effets indiquent que les Ag comme l'EPA sont susceptibles d'influencer les différents courants ioniques qui participent, non seulement au déroulement du potentiel d'action mais aussi à l'excitabilité cellulaire cardiaque.

- **Le courant sodique:**

Les n-3 PUFA induisent différents effets électrophysiologiques sur le courant sodique  $I_{Na}$ . Ils ont une action inhibitrice « dose-dépendante » sur  $I_{Na}$ . Cette inhibition est fortement dépendante du voltage et est associée à un important déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs (Xiao et al., 1995; 1998; 2000; 2004; Leifert

et al., 1999). Toutefois la sensibilité de  $I_{Na}$  vis-à-vis des Ag paraît dépendre de la structure du canal et des sous unités associées. En effet, son  $IC_{50}$  (concentration nécessaire à l'obtention de 50% d'inhibition du courant) est de 4,8  $\mu M$  pour les cardiomyocytes de rat néonataux (Xiao et al., 1995) tandis qu'elle est de 0,51  $\mu M$  lorsque seule la sous unité  $\alpha$  du canal sodique cardiaque ( $hH1_{\alpha}$ ) est exprimée dans une lignée cellulaire rénale humaine (HEK293t) (Xiao et al., 1998). La co-expression de la sous unité  $\beta_1$  avec  $hH1_{\alpha}$  dans les lignées HEK293t, diminue l'effet bloquant de l'EPA sur  $I_{Na}$  avec un  $IC_{50}$  de 3,9  $\mu M$  plus proche de celui observé dans les cardiomyocytes de rats néonataux (Xiao et al., 2000). Dans ces différentes préparations, les PUFA induisent un déplacement important de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. Un déplacement d'environ -20 mV est observé lorsque 10  $\mu M$  d'EPA sont appliqués sur les cardiomyocytes néonataux de rat, 25  $\mu M$  dans le cas de cardiomyocytes de rats adultes et 5  $\mu M$  lorsque les sous unités  $\alpha$  et  $\beta_1$  sont co-exprimées dans les lignées HEK293t (Xiao et al., 1995; 2000; Leifert et al 1999). Lorsque seule la sous unité  $\alpha$  est exprimée, la perfusion de 5  $\mu M$  d'EPA induit un déplacement de -27,8 mV de la courbe d'inactivation (Xiao et al., 1998). L'ensemble des études électrophysiologiques n'indique aucun effet des n-3 PUFA sur l'activation de  $I_{Na}$  (Xiao et al., 1995; 1998; 2000). Cependant les études de Leifert et al. (1999), montrent un déplacement de la courbe d'activation compris entre 8 et 10 mV vers des potentiels plus positifs lors de la perfusion de 25  $\mu M$  de EPA, d'acide docosahexaénoïque (DHA) et d'acide  $\alpha$ -linoléique.

Il est clair et admis que les n-3 PUFA influencent  $I_{Na}$ , cependant de nombreuses données contradictoires existent pour les autres types d'Ag. C'est notamment le cas de l'acide oléique (OA), un acide gras mono-insaturé. En effet, si l'absence d'effet de cet Ag sur  $I_{Na}$  a pu être montrée (Leifert et al., 1999, Xiao et al., 1995), il apparaît que lorsque seule la sous unité  $\alpha$  du canal est exprimée, l'OA induit une inhibition de 53 % de  $I_{Na}$  (Xiao et al., 1998). Toutefois, en présence de la sous-unité  $\beta$  (co-exprimée avec  $\alpha$ ), l'OA n'a plus d'effet sur le courant rapide sodique, ce qui laisse penser que l'effet inhibiteur serait non spécifique (Xiao et al., 2000). Cependant, une autre étude a montré que l'OA ainsi que l'acide arachidonique (AA) pouvaient induire une diminution de la conductance sodique et un déplacement vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'inactivation dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques (Bendahhou et al., 1997). Il est donc difficile d'appréhender clairement le rôle de cet Ag dans la modulation de  $I_{Na}$  des cellules cardiaques.

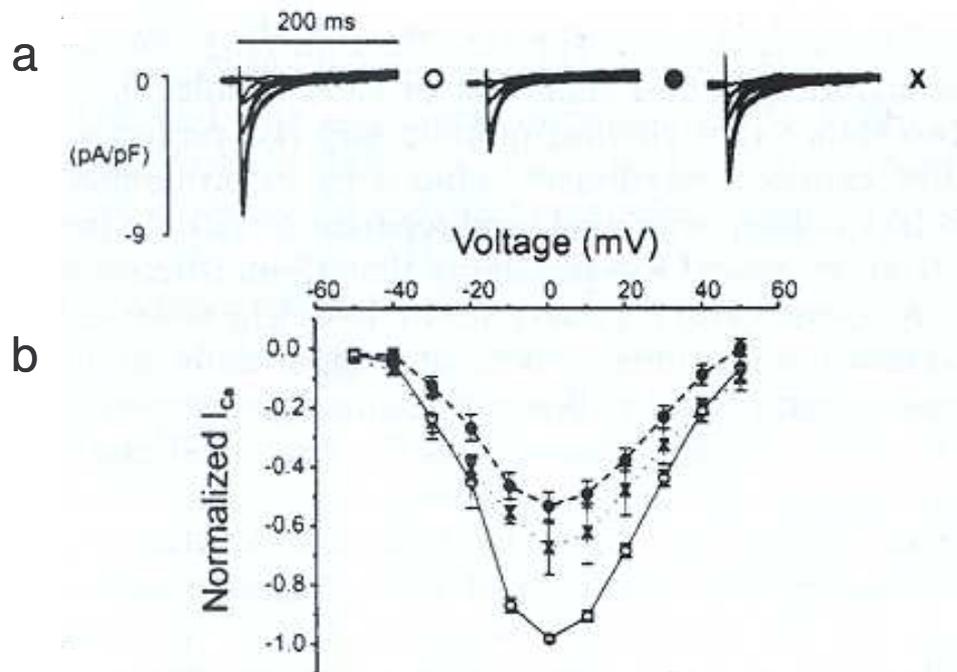
- **Le courant calcique de type L:**

L'étude de l'effet de différents PUFA sur le courant calcique cardiaque montre qu'un certain nombre d'entre eux, tels que l'EPA, le DHA, l'AA ou encore l'acide linoléique (LA), ont une action inhibitrice dépendante de la concentration. Cette inhibition est rapide et réversible (Figure 15). Il apparaît que parmi les n-3 PUFA, l'EPA est celui qui a l'effet le plus marqué. 5  $\mu\text{M}$  d'EPA inhibe  $I_{\text{Ca,L}}$  de 83% contre respectivement 62%, 76% et 76% pour les mêmes concentrations de DHA, AA et LA (Xiao et al., 1997). La concentration d'EPA nécessaire pour produire une inhibition de 50% de  $I_{\text{Ca,L}}$  est de 0,8  $\mu\text{M}$  dans les cellules cardiaques de rats néonataux et de 2,1  $\mu\text{M}$  pour les myocytes cardiaques de rats adultes (Xiao et al., 1997). Alors que l'application de n-3 PUFA n'altère pas la forme de la courbe courant potentiel, elle induit un léger déplacement vers des potentiels négatifs de la courbe d'inactivation (de -3 à -5 mV). L'activation du courant calcique n'est pas modifiée par la perfusion de n-3 PUFA. Les effets des PUFA sur  $I_{\text{Ca,L}}$  sont donc très proches de ceux observés sur  $I_{\text{Na}}$ , excepté un déplacement de la courbe d'inactivation plus faible (pour revue: Leaf et al., 2003).

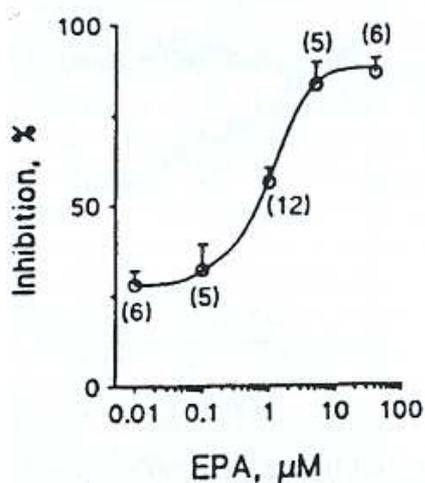
De la même manière que les effets de certains acides gras sur  $I_{\text{Na}}$  sont controversés, l'influence de certains acides gras sur  $I_{\text{Ca,L}}$  reste obscure. C'est notamment le cas de l'OA pour lequel plusieurs études contradictoires subsistent. En effet, La perfusion de 5  $\mu\text{M}$  de cet acide gras mono-insaturé ne semble pas avoir d'effet sur les myocytes cardiaques de rat néonataux (Xiao et al., 1997). Une étude de Huang et al. (1992) a montré qu'une concentration de 3 et 10  $\mu\text{M}$  d'OA induisait une augmentation de  $I_{\text{Ca,L}}$  respectivement de 337 et 713 % sur les myocytes ventriculaires de cobaye. Toutefois, des travaux sur le muscle lisse intestinal de lapin indiquent que la perfusion de 10 et 30  $\mu\text{M}$  d'OA induisait une diminution de  $I_{\text{Ca,L}}$  respectivement de 16 et 26% (Shimada et Somlyo, 1992). Il apparaît donc difficile en l'état actuel des connaissances d'appréhender clairement le rôle de cet acide gras sur  $I_{\text{Ca,L}}$

- **Les courants potassiques:**

Différentes études ont montré que les PUFA pouvaient également modifier différents courants potassiques cardiaques tels que le courant  $I_{\text{To}}$  et le courant potassique retardé. Ces courants, impliqués dans la repolarisation cellulaire, sont inhibés par l'application de

**Figure 15**

**A.** Effet de la perfusion de 1,5  $\mu\text{M}$  d'EPA sur le courant calcique de type L des cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes. a. Exemples de courants en condition contrôle (ronds blancs), lors de la perfusion d'EPA (ronds noirs) et après lavage de l'EPA (croix). b. Relation entre l'amplitude (normalisée) du courant et le potentiel pour les trois conditions (Xiao et al., 1997).



**B.** « Dose-dépendance » de l'effet supprimeur de l'EPA sur le courant calcique de type L.  $\text{IC}_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ . D'après Xiao et al., (1997).

PUFA (Honore et al., 1994; Bogdanov, 1998; Xiao et al., 2002). Le courant  $I_{K1}$  responsable du maintien du potentiel de repos n'apparaît pas être affecté par la perfusion de PUFA (Xiao et al., 2002). L'acide oléique semble également bloquer le courant  $I_{to}$  (Crumb et al., 1999).

## **2- Effets sur l'homéostasie calcique et la contraction**

L'effet modulateur des Ag sur de nombreuses conductances ioniques et notamment les conductances calciques peut potentiellement engendrer des modifications de l'homéostasie calcique et de la contraction cellulaire. L'EPA, le DHA et l'OA ont un effet inhibiteur sur les canaux sensibles à la ryanodine du RS chargés de libérer le calcium de ces stocks internes vers le cytoplasme lors du CEC (Negretti et al., 2000; Swan et al., 2003; Honen et al., 2003). L'EPA et le DHA peuvent aussi modifier l'entrée de calcium par le sarcolemme via les canaux calciques de type L. Comme il est décrit dans la partie III-B-5, une hypoxie cellulaire va avoir pour conséquence d'augmenter la concentration intracellulaire en calcium libre. Si cette augmentation est suffisamment importante, elle va conduire à l'activation d'un courant  $I_i$  responsable de la génération d'arythmie cardiaque. La diminution de la concentration en calcium intracellulaire induite par ces Ag, pourrait ainsi limiter les effets des surcharges calciques induites lors d'une ischémie cardiaque et prévenir l'apparition d'arythmies qui en résulte. En outre, dans le cœur de mammifère la concentration en Ag non estérifiés cellulaire augmente en situation hypoxique (Van Der Vusse et al., 1992). Cette augmentation serait la conséquence d'une diminution de leur oxydation mitochondriale. L'activité de phospholipases dégradant les stocks intracellulaires et membranaires favoriserait cette accumulation. Une augmentation des NEFA induisant une diminution de calcium intracellulaire, pourrait ainsi permettre de lutter plus efficacement contre l'apparition du  $I_i$  activé par une surcharge calcique.

En conclusion, il est clair que les Ag jouent un rôle important dans la modulation de l'activité cardiaque. Leurs nombreux effets sur les différentes conductances ioniques, impliquées dans l'activité rythmique et contractile cardiaque, pourraient correspondre au principal mode d'action de ces Ag sur le cœur. L'influence d'acide gras comme l'EPA et

le DHA sur les courants ioniques et l'activité cardiaque en générale semble claire. En revanche, le rôle joué par des acides gras comme l'acide oléique reste controversé. Il en va de même pour l'action de ce dernier lors de conditions pathologiques comme l'ischémie et l'arythmie cardiaque.

# *Matériels et méthodes*

## **I- Matériels Biologiques.**

### **A. Alimentations expérimentales**

Les trois alimentations expérimentales testées ont été préparées au laboratoire ARN (Adaptation Reproduction Nutrition) de l'IFREMER de Brest sous la forme de granulés de 4,5 mm de diamètre. Les trois formulations étudiées avaient une composition de base identique et étaient supplémentées avec des huiles de trois origines différentes *i.e.*, huile de foie de morue (HFM), huile de colza (HC) et huile de palme (HP). La composition en acides gras des huiles utilisées se retrouve dans ces alimentations (Tableau MM 1). L'alimentation enrichie en huile de foie de morue présente un pourcentage plus élevé en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3); l'alimentation supplémentée en huile de colza est riche en acide oléique (OA, 18:1 n-9) et linoléique (LA, 18:2 n-6) tandis que l'alimentation à forte teneur d'huile de palme contient des taux élevés d'OA et de LA mais également d'acide gras saturés (SFA; principalement l'acide palmitique; 16:0).

### **B. Animaux expérimentaux et protocole d'alimentation**

Les bars utilisés proviennent de la ferme aquacole «AQUAPOLE» située au nord de l'île de Ré. Ils sont élevés dans des bassins d'un volume approximatif de 400 litres. Ces bassins sont situés dans une pièce où le cycle naturel jour-nuit est respecté. Ils sont alimentés en eau re-circulée et filtrée dont la température et la salinité sont maintenues respectivement à 20°C et 30 ‰. Ces poissons sont acclimatés dans ces conditions durant une période d'un mois au cours de laquelle ils sont nourris avec une alimentation commerciale (Bar D PerformNatura 4.5; Sica du Gouessant, Lamballe, France).

Suite à cette période d'acclimatation aux conditions de laboratoire, les bars sont répartis en trois lots expérimentaux (deux réplicats par lots, quinze poissons par réplicats). Après une période de jeûne préliminaire de deux semaines, destinée à diminuer leurs stocks lipidiques, ces poissons sont nourris quotidiennement *ad libitum* pendant une période de quatre mois minimum avec l'un des trois régimes décrit plus haut.

**Tableau MM 1**

	Acides Gras Alimentaires		
	HFM	HC	HP
14:0	3,29	0,70	0,91
16:0	13,33	8,49	20,39
16:1n-7	4,09	0,93	0,78
18:0	2,37	1,71	2,51
18:1n-7	2,63	2,94	1,61
18:1n-9	27,31	43,94	43,52
18:2n-6	10,18	19,24	14,91
18:3n-3	4,54	8,53	3,96
18:4n-3	1,62	0,45	0,39
20:1n-9	5,27	3,50	2,63
20:4n-3	0,61	0,08	0,07
20:4n-6	0,38	0,11	0,09
20:5n-3	6,98	2,30	1,09
22:1n-11	3,68	0,86	1,11
22:5n-3	1,15	0,16	0,12
22:6n-3	6,29	2,21	1,88
SFA	20,65	12,71	26,05
MUFA	45,49	53,79	50,97
PUFA	33,86	33,51	22,97

Composition en acides gras des lipides de l'alimentation en pourcentage d'acides gras totaux. HFM, alimentation enrichie en huile de foie de morue; HC alimentation enrichie en huile de colza; HP, alimentation enrichie en huile palme. SFA, Acides gras saturés; MUFA, acide gras mono-insaturés; PUFA, acide gras poly-insaturés.

Parallèlement, un quatrième lot de bars, nourri deux fois par semaine avec une alimentation commerciale (Bar D PerformNatura 4.5; Sica du Gouessant, Lamballe, France), servira pour des expérimentations réalisées à l'échelle cellulaire et moléculaire. Il s'agit notamment de l'étude des effets directs de l'acide oléique sur le courant  $I_{Ca,L}$  des cardiomyocytes ventriculaires (chapitre II-1).

## **II- Mesure des performances cardio-respiratoires des poissons.**

Toutes les expériences sont réalisées à 20°C.

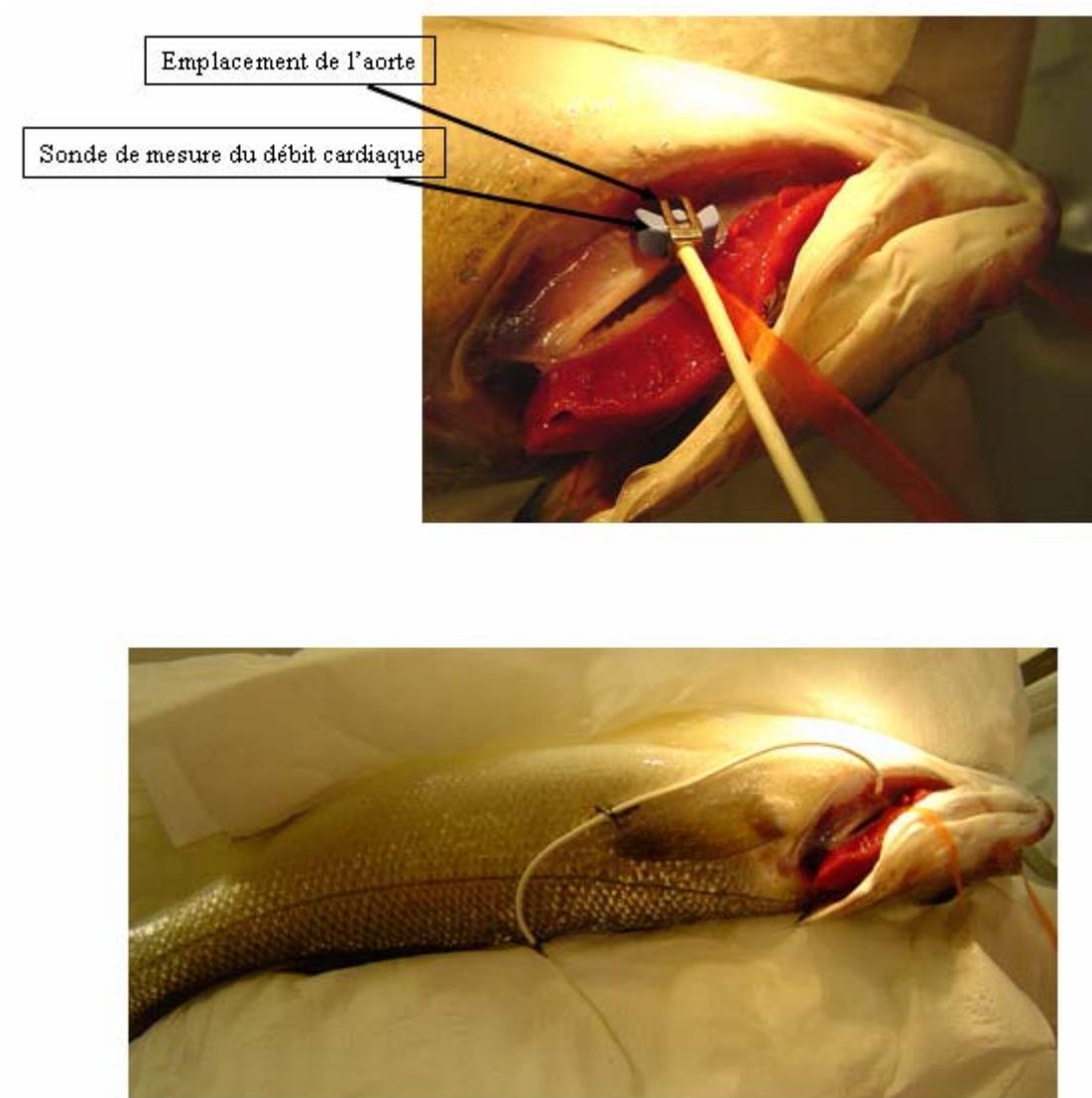
### **A. Chirurgie cardiaque**

Les bars sont préalablement anesthésiés dans de l'eau de mer contenant 0,1 g.L<sup>-1</sup> de tricaine methane sulphonate (MS-222, Sigma). Ils sont ensuite transférés sur une table d'opération où leurs branchies sont irriguées avec une eau de mer aérée contenant 0,05 g.L<sup>-1</sup> de MS-222. Une légère incision d'un centimètre est réalisée sur la membrane située derrière les branchies. L'aorte ventrale est ensuite dégagée afin de placer une sonde Transonic à ultrason de type 2S (résolution 0,1 ml.min<sup>-1</sup>, précision  $\pm 15\%$ ; Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA). La sonde est maintenue en place par un fermoir métallique. La membrane est ensuite refermée grâce à deux points de sutures et le fil de la sonde est fixé sur le poisson à l'aide de trois sutures cutanées (Figure MM 2). Suite à l'opération chirurgicale, le poisson récupère pendant 48 h dans une chambre en PVC suffisamment petite pour l'empêcher de nager et de se retourner. Cette chambre est alimentée en eau de mer à 20°C d'une salinité de 30 ‰.

### **B. Tunnel de nage**

Le tunnel de nage utilisé est dérivé du tunnel de nage décrit par Brett (1964). C'est un système fermé (Volume total 49 L) dans lequel un courant d'eau est généré par une hélice

**Figure MM 2**



Photographies représentant la pose d'une sonde de mesure du débit cardiaque.

reliée à un moteur électrique dont la vitesse de rotation est commandée par un potentiomètre. La vélocité du courant est contrôlée par la vitesse de rotation de l'hélice. Le poisson est placé dans la chambre de nage délimitée par un système de nid d'abeille en amont et par une grille en aval. Le nid d'abeille permet de générer un flux laminaire d'eau à l'intérieur de cette chambre. Le poisson est orienté de manière à nager dans le sens inverse du courant (Figure MM 3). De cette manière, il est possible de contrôler la vitesse de nage du poisson en faisant varier la vélocité du courant. Pour nos expérimentations, les bars sont placés dans le tunnel au moins douze heures avant le début de l'expérience. Au cours de cette période d'acclimatation, la vitesse de nage est fixée à 0,5 longueur corporelle par seconde ( $BL.s^{-1}$ ). A cette vitesse, les bars maintiennent simplement leur position par de légers mouvements des nageoires et de la queue.

Au cours de l'épreuve d'effort, les poissons sont exposés à des augmentations par paliers de la vitesse du courant. A chaque palier, la vitesse de nage est maintenue constante durant trente minutes. Les différentes vitesses utilisées sont de 0,5; 1; 2; 3; 3,5 et 4  $BL.s^{-1}$ . Les poissons sont considérés comme ayant atteint leur vitesse maximale lorsqu'ils ne sont plus capables de maintenir leur position dans le tunnel. La vitesse critique de nage du poisson ( $U_{crit}$ ; vitesse maximale à laquelle le poisson peut nager) est alors calculée de la manière suivante:

$$U_{crit} = V_{(n-1)} + \frac{t_n}{T}$$

où  $V_{(n-1)}$  correspond à la vitesse du palier précédant,  $t_n$  au temps pendant lequel le poisson a nagé au dernier palier et  $T$  le temps défini par palier (30 min).

Le tunnel de nage est un système hermétiquement clos et permet de mesurer les variations de teneur en oxygène de l'eau à l'aide d'une électrode à oxygène polarographique de type Orbisphère Clarke (Orbisphere Laboratory, Geneve, Suisse). Cette électrode est approvisionnée en eau par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique branchée sur le tunnel. L'électrode est reliée à un oxymètre lui-même connecté à un ordinateur. Pour chaque palier de vitesse, le volume d'eau présent dans le tunnel de nage ( $V$ ), la masse du poisson ( $m$ ), la variation de la teneur en oxygène de l'eau ( $\Delta O_2$ ) pendant une période donnée ( $\Delta t$ ) permet de calculer la consommation d'oxygène du poisson ( $MO_2$ ; en  $mg.Kg^{-1}.h^{-1}$ ):

$$MO_2 = \frac{V \times \Delta O_2}{\Delta t \times m}.$$

**Figure MM 3**

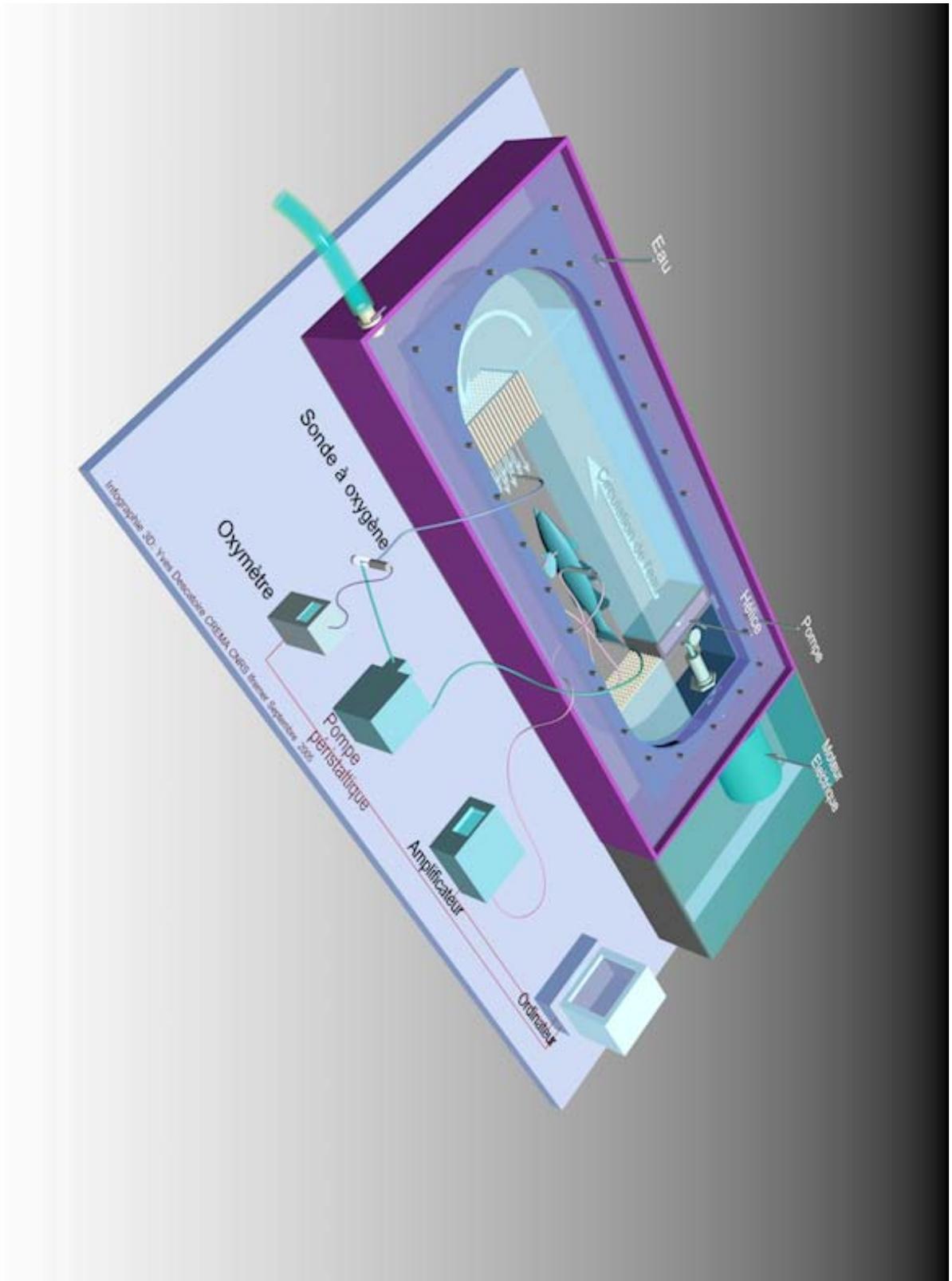


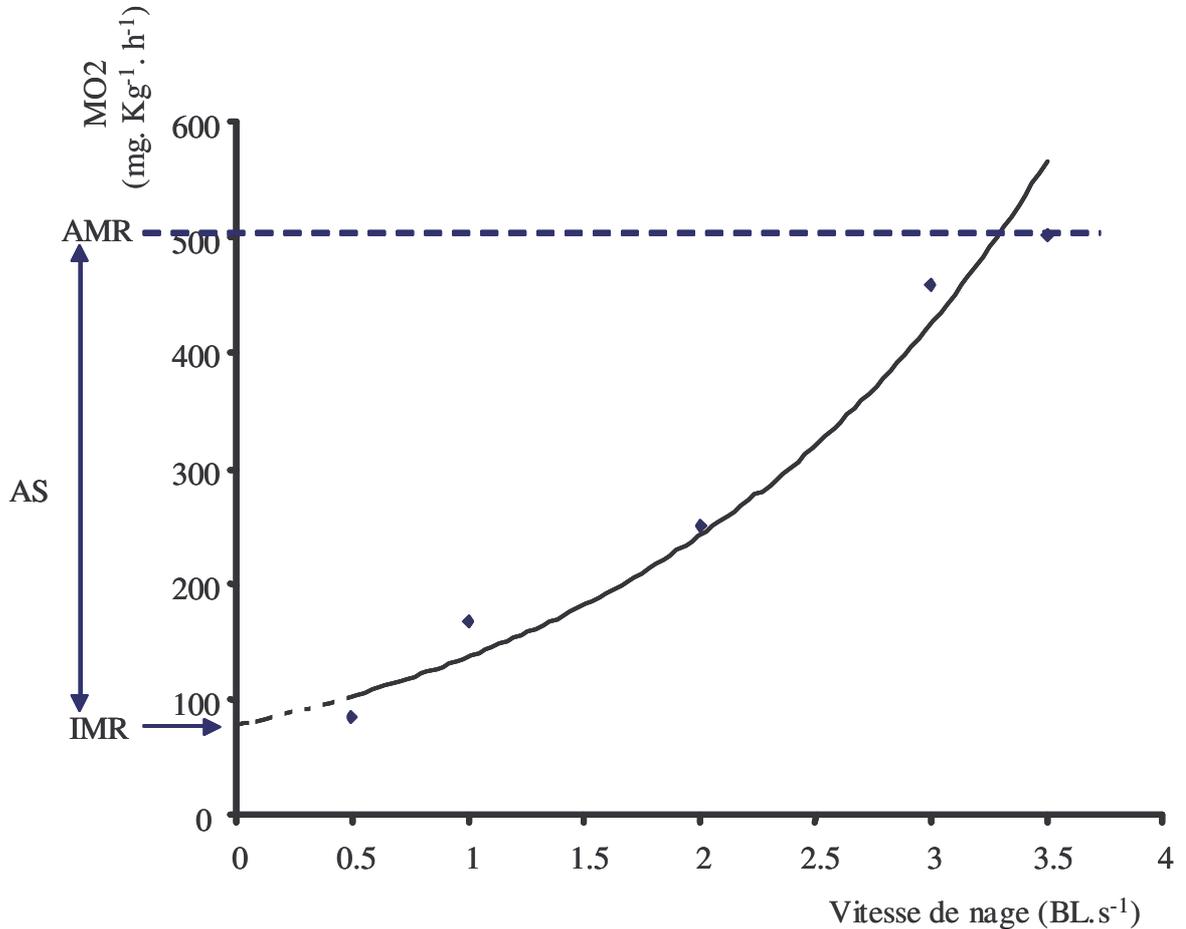
Schéma du tunnel de nage (réalisé par Yves Descatoire, CREMA L'Hommeau)

Cette mesure s'effectue de façon automatique deux à trois fois par palier grâce à un système d'acquisition de données. Afin de retrouver le niveau d'oxygène de départ, l'eau du tunnel de nage est renouvelée entre chaque mesure à l'aide d'une pompe. La consommation d'oxygène du poisson inactif (« Immobile metabolic rate »; IMR) est déterminée en extrapolant, à 0 BL.s<sup>-1</sup>, la relation entre la MO<sub>2</sub> et la vitesse de nage (figure MM 4). La consommation maximale d'oxygène (« Active Metabolic Rate »; AMR) des poissons est identifiée au cours de l'épreuve de nage. La différence entre AMR et IMR, appelée Aérobie scope (AS), indique la capacité des poissons d'augmenter leur consommation d'oxygène pendant l'exercice.

A chaque vitesse de nage, le débit cardiaque ( $Q$ ) est mesuré en ml. min<sup>-1</sup> à partir du signal obtenu au moyen de la sonde posée sur l'aorte ventrale. En divisant  $Q$  par la masse corporelle du poisson il est possible d'obtenir une valeur de débit normalisée (ml. min<sup>-1</sup>. Kg<sup>-1</sup>), comparable d'un poisson à un autre. Cette sonde est connectée à un amplificateur, lui-même relié, *via* une carte d'acquisition, à un ordinateur équipé d'un logiciel réalisé sous Labview (National instruments version 5.1). L'acquisition et le traitement du signal sont effectués grâce à ce logiciel décrit par Axelson et al., (2002). La fréquence d'échantillonnage est de 20 Hz. Le flux pulsatile enregistré permet d'obtenir la fréquence cardiaque ( $f_q$ , battement par minute). Le volume d'éjection systolique (VES; ml.g<sup>-1</sup>) est calculé en divisant  $Q$  par  $f_q$  et est normalisé par rapport à la masse du ventricule du poisson. Le débit de routine ( $Q_{min}$ ) représente la valeur minimale de débit mesuré lorsque le poisson est à 0,5 BL. s<sup>-1</sup>. La capacité du cœur à augmenter son débit cardiaque (Cardiac scope;  $Q_{scope}$ ) est définie par la différence entre le débit maximal ( $Q_{max}$ ) et le débit de routine ( $Q_{min}$ ).

## **C. Hypoxie**

Pour soumettre les poissons à différents niveaux d'oxygénation, l'eau qui alimente le tunnel est soumise à un bullage d'azote. Ceci a pour effet de diminuer rapidement la teneur en oxygène de l'eau (mesurée en pourcentage de saturation d'oxygène). Différents paliers d'une durée de vingt minutes sont appliqués au cours de l'expérience. Chaque palier est obtenu en introduisant l'eau préalablement dépourvue en oxygène dans le tunnel, par l'intermédiaire d'une pompe. Les différents niveaux de saturation d'oxygène utilisés sont de 90 % (eau normoxique) puis de 40 %, 30 %, 20 %, 10 % et 5 %. Lorsque les poissons se retournent (face ventrale vers le haut), la saturation en oxygène ainsi que le temps tenu au

**Figure MM 4**

Détermination de la consommation d'oxygène du poisson inactif (IMR) et de la consommation d'oxygène maximale au cours de la nage (AMR). La différence entre IMR et AMR (AS) représente la capacité du poisson d'augmenter sa consommation d'oxygène pendant l'effort. Les valeurs de consommation d'oxygène en fonction de la vitesse de nage sont ajustées par une courbe de type exponentiel dont l'équation se définit par  $Y = Ae^{Bx}$  où A est la valeur de IMR.

dernier palier hypoxique sont notés. La consommation d'oxygène et le débit cardiaque sont enregistrés pour chaque palier. Tout au long de l'expérience, le courant dans le tunnel est maintenu à  $0,5 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ .

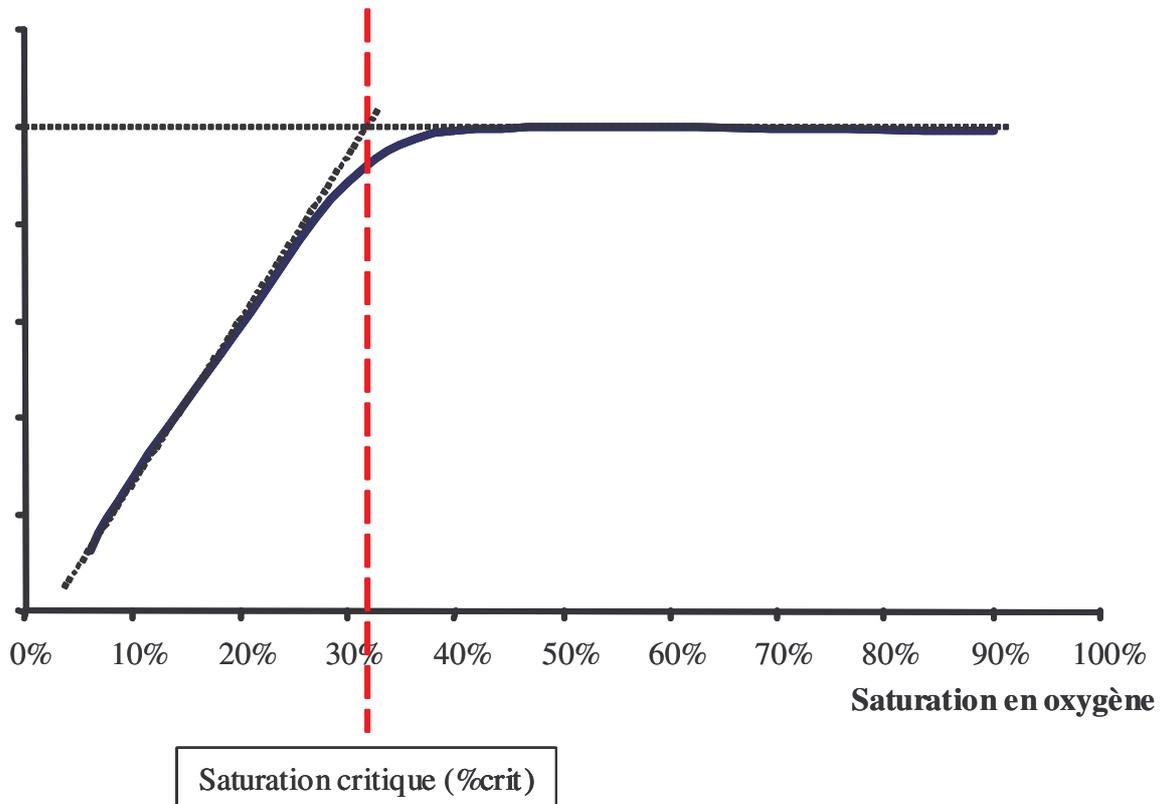
La saturation critique d'oxygène correspond à la valeur de saturation à partir de laquelle le poisson est incapable de maintenir son débit cardiaque, et sa consommation d'oxygène, à des niveaux similaires à ceux enregistrés en normoxie. Cette saturation critique est déterminée graphiquement par l'intersection entre le plateau initial des valeurs de  $Q$  et de  $\text{MO}_2$ , et la pente de la diminution de ces valeurs au cours des différents paliers hypoxiques (figure MM 5).

Suite à cette épreuve d'hypoxie, les poissons sont rapidement replacés en condition normoxique pendant 30 minutes. Après cette période de récupération, ils sont soumis à une épreuve de nage réalisée selon le protocole décrit précédemment.

## **D. Analyses statistiques**

Pour chaque variable mesurée, les différences entre les alimentations sont estimées par des analyses de variance à une voie (ANOVA). Une probabilité inférieure à 5 % ( $P < 0,05$ ) représente une différence significative. Des analyses à composante principale (ACP) sont utilisées pour établir un lien entre la composition en Ag du tissu cardiaque, et les différents traits physiologiques des poissons (IMR, AMR, AS,  $Q$ ,  $Q_{\min}$ ,  $Q_{\max}$ ,  $Q_{\text{scope}}$ ...) mesurés pendant l'épreuve de nage.

**Figure MM 5**



Détermination de la saturation critique (%crit) d'oxygène pour le débit cardiaque ( $Q$ ) ou la consommation d'oxygène ( $MO_2$ ) du poisson.

### **III- Dissociation cellulaire**

La technique de dissociation cellulaire utilisée est basée sur le principe de perfusion rétrograde du cœur par le bulbe artériel. Le protocole est dérivé de celui mis au point par Fischmeister et Hartzell (1986) sur le cœur de grenouille et de celui de Vornanen (1997) sur le cœur de poissons téléostéens.

Les poissons sont anesthésiés dans de l'eau de mer contenant 0,1 g. L<sup>-1</sup> de tricaine methane sulphonate (MS-222, Sigma). Le cœur est ensuite rapidement prélevé et plongé dans une solution physiologique à 4°C (Solution 1, Tableau MM 6). Un cathéter est alors introduit dans le ventricule par le bulbe artériel. Le sang restant dans le cœur est doucement éjecté à l'aide d'une seringue placée sur la canule contenant la solution 1. Le cœur est placé sur un système de perfusion de type Langendorff où différentes solutions à 20°C vont être appliquées (Tableau MM 6 et Figure MM 7).

- Digestion enzymatique:

Le cœur est tout d'abord perfusé avec la solution 1 à 20°C pendant 2 minutes afin de lui permettre de retrouver une activité contractile. Par la suite, il est perfusé pendant 5 minutes avec une solution dépourvue de calcium et supplémentée avec de l'EGTA (solution 2). La déplétion en calcium entraîne un arrêt des contractions et favorise la fragilisation des connexions intercellulaires myocardiques. Par la suite, le cœur est perfusé par la solution 2 supplémentée avec 100 mM de BSA (Bovin Serum Albumin) et des enzymes protéolytiques: Trypsine (Type III, 0,24 mg.ml<sup>-1</sup>) et collagénase (type IA, 0,36 mg.ml<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich; St Quentin-Fallavier, France). Cette solution permet la digestion des tissus interstitiels. Elle est perfusée pendant 10 à 15 minutes en fonction de la taille du cœur.

- Dissociation mécanique

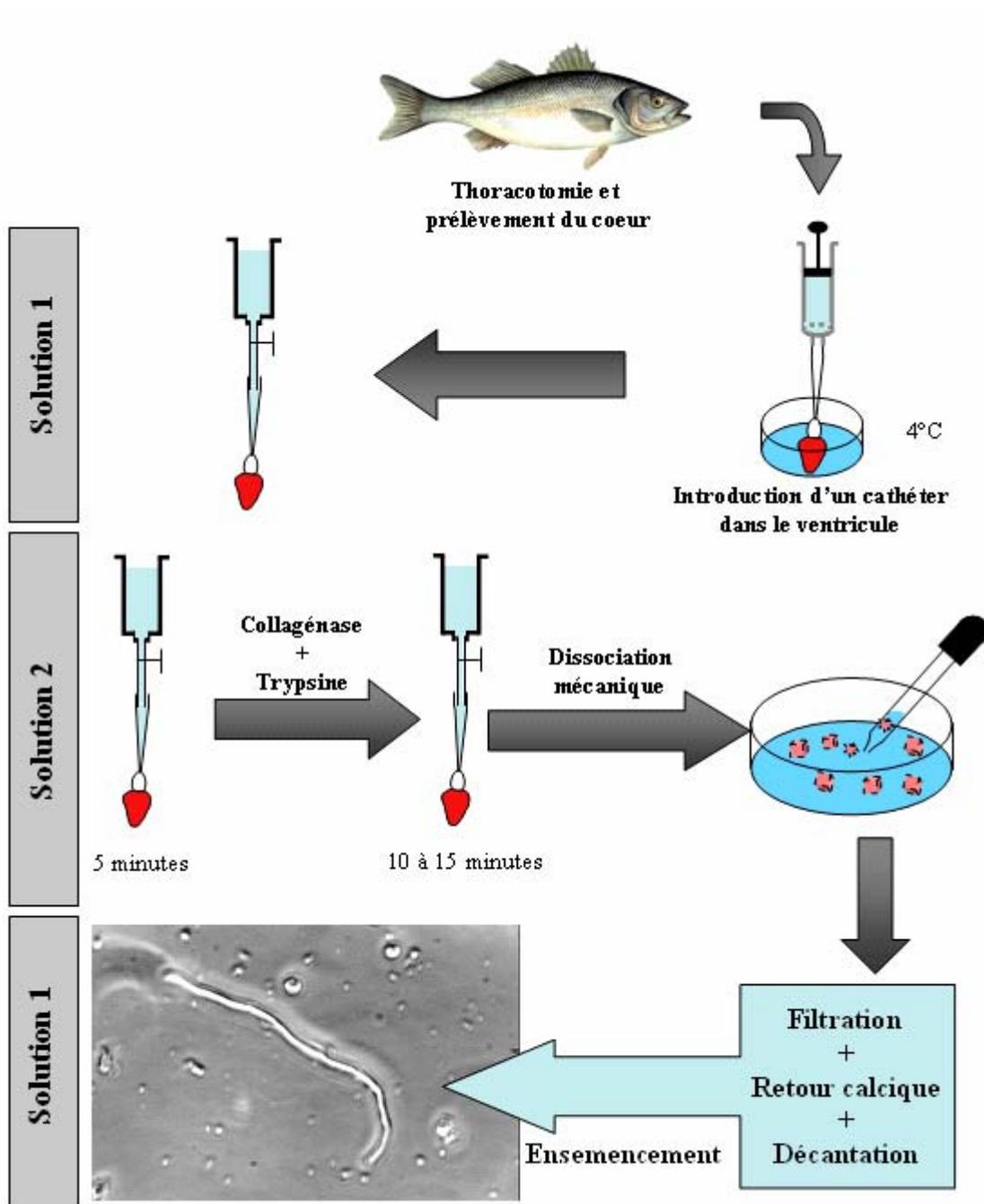
Le cœur est ensuite retiré du système de perfusion et placé dans la solution 2. Le bulbe et l'atrium sont retirés et le ventricule est rapidement découpé en petits fragments. Les morceaux de ventricule sont alors agités mécaniquement à l'aide d'une pipette pasteur rodée à la flamme. Ceci a pour effet de libérer les myocytes ventriculaires.

**Tableau MM 6**

	<b>Solution 1</b>	<b>Solution 2</b>
NaCl	130	100
CsCl	5,4	–
KCl	–	10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,04	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	1,2
MgSO <sub>4</sub>	2,5	6,7
CaCl <sub>2</sub>	1,8	–
Taurine	–	50
Glucose	10	20
Hepes	10	10
EGTA	–	0,1
pH	7,6 (CsOH)	7,1 (KOH)
Osmolarité (mOsm.l <sup>-1</sup> )	290	310

Composition des solutions physiologiques utilisées pour la dissociation cellulaire (concentration en mM).

**Figure MM 7**



Représentation schématique du protocole de dissociation enzymatique et mécanique des cardiomyocytes ventriculaires de bars.

La suspension cellulaire obtenue est alors filtrée sur une toile à blutter (pore de 200  $\mu\text{m}$ ) afin d'éliminer les amas résiduels. Le calcium est progressivement augmenté en ajoutant lentement la solution 1 à la suspension cellulaire afin de minimiser les effets néfastes du paradoxe calcique. Les cellules sont mises à décanter 20 minutes dans cette solution. Le culot de cellules est ensuite repris dans la solution 1 et les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri et conservées à 4°C jusqu'à utilisation. Elles sont utilisées dans les 36 heures suivant la dissociation et sont préalablement replacées à 20°C vingt minutes avant le début de l'expérience.

Les cardiomyocytes obtenus présentent les caractéristiques morphologiques typiques des cardiomyocytes de téléostéens. Ce sont de longues (plus de 100  $\mu\text{m}$ ) et très fines (section inférieure à 10  $\mu\text{m}$ ) cellules.

## **IV- La technique du patch-clamp**

### **A. Présentation de la technique**

Cette technique permet l'enregistrement des courants ioniques transmembranaires qui transitent au travers de structures protéiques appelées canaux ioniques. Elle fut mise au point à la fin des années 70 par Neher et Sakman (1976) puis améliorée par ces mêmes auteurs (Hamill et al., 1981) ce qui leur valu l'obtention du prix Nobel de médecine et de physiologie en 1991.

Cette technique consiste à isoler électriquement une portion de membrane en formant un contact étroit entre une pipette de verre (dont le diamètre de la pointe est d'environ 1  $\mu\text{m}$ ) et la membrane plasmique d'une cellule. Une légère succion à l'intérieur de la pipette permet de réaliser un scellement (seal) de résistance électrique très élevée (giga seal d'environ 10 G $\Omega$ ). La haute résistance de ce « seal » assure l'isolation électrique de la portion de membrane présente sous la pipette et augmente la résolution du signal enregistré.

Cette technique permet de mesurer la capacité membranaire de la cellule. Elle permet également selon la configuration utilisée, d'enregistrer des courants ioniques macroscopiques résultant de l'activité de l'ensemble des canaux fonctionnels présents à la surface de la membrane plasmique ou l'activité microscopique d'un ou plusieurs canaux isolés. Il existe quatre configurations différentes (Figure MM 8):

- **La configuration «cell-attached»** ou cellule attachée est obtenue par la formation du giga seal. Les courants ioniques sont enregistrés au niveau de la portion de membrane présente sous la pipette. C'est la configuration la plus physiologique étant donné que l'intégrité de la cellule est préservée. Toutefois, le milieu intracellulaire n'est pas contrôlé. Le potentiel imposé à l'intérieur de la membrane sous la pipette ( $V_i$ ) correspond alors à la différence entre le potentiel de la cellule ( $V_r$ ) et celui de la pipette ( $V_{\text{pip}}$ ), soit:  $V_i = V_r - V_{\text{pip}}$ . Cette configuration permet l'enregistrement de courants à l'échelle unitaire.

**Figure MM 8**

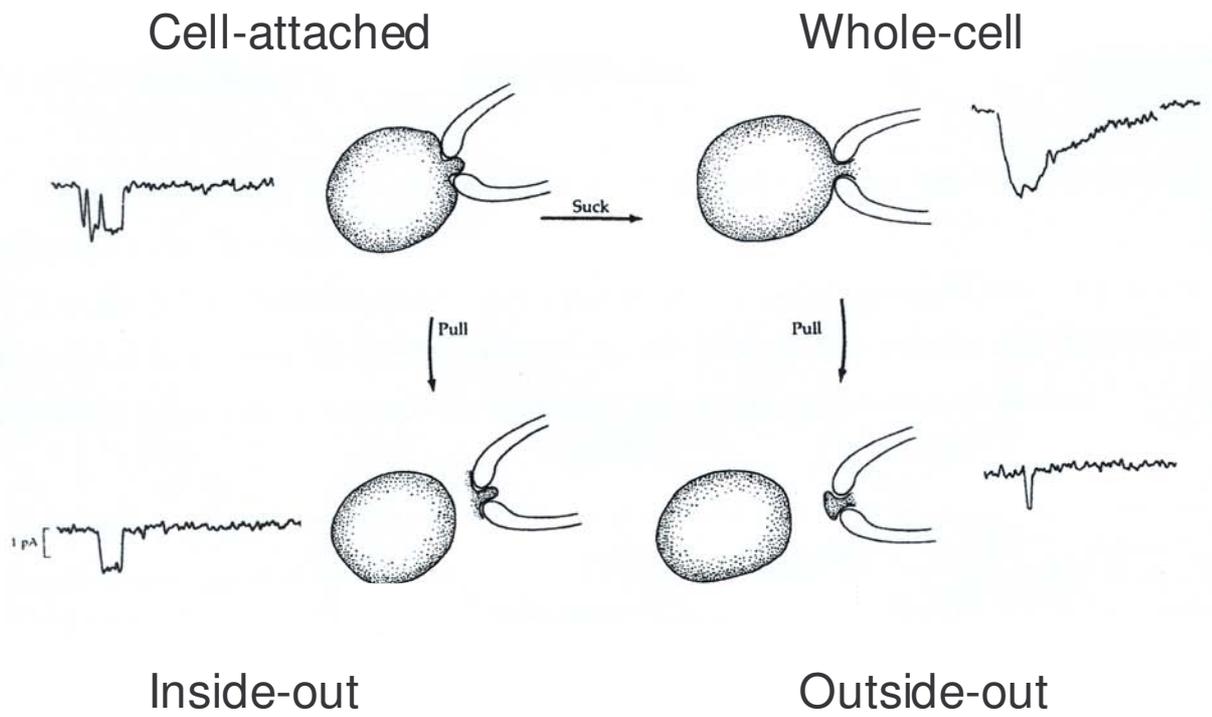


Schéma de quatre configurations différentes de patch-clamp.

- **La configuration «Whole-cell recording»** ou cellule entière est obtenue à partir du stade «cell-attached» en appliquant une succion supplémentaire dans la pipette afin de percer la fraction de membrane présente sous la pipette. Lorsque la membrane est rompue, le milieu intrapipette peut diffuser dans le milieu intracellulaire. Dans ces conditions, le potentiel de la cellule est celui imposé par la pipette:  $V_i = V_{pip}$ . Cette configuration permet l'enregistrement de l'ensemble des courants traversant la membrane. **C'est cette configuration qui est utilisée tout au long de l'étude.**
  
- **La configuration «inside-out»** est obtenue après excision de la membrane à partir de la configuration «cell-attached» par un retrait de la pipette. La face interne de la membrane se retrouve alors en contact avec le milieu extérieur. Dans cette configuration, le potentiel imposé est alors l'opposé de celui de la pipette:  $V_i = -V_{pip}$ . Elle permet l'enregistrement de courants à l'échelle unitaire.
  
- **La configuration «outside-out»** est obtenue à partir de la configuration «whole-cell» où par retrait de la pipette, une portion de membrane est arrachée pour former une vésicule à la pointe de la pipette. La face externe de la membrane est alors exposée au milieu extérieur. Dans cette configuration le potentiel imposé est égale au potentiel de pipette:  $V_i = V_{pip}$ . Elle permet l'enregistrement de courants à l'échelle unitaire

## **B. Dispositif expérimental**

### **1- Le système de microscopie**

L'observation des cellules lors de l'approche du système de périfusion et de la pipette de patch s'effectue à l'aide d'un microscope inversé à visée binoculaire (Zeiss, Axiovert 25).

## **2- Le circuit électronique**

Il est constitué d'un amplificateur de patch clamp Axopatch 200B muni d'une tête CV 203BU (Axon instrument, Foster city, Ca, USA). L'amplificateur possède trois fonctions importantes:

- la correction du potentiel de jonction: la différence de composition ionique qui existe à l'interface liquide intrapipette/liquide extracellulaire lorsque la pipette est plongée dans le bain, est à l'origine d'une différence de potentiel ou potentiel de jonction qui doit être corrigée avant la réalisation du seal.
- la compensation de la résistance série: il est possible de compenser les résistances dues à la pipette et à la structure intracellulaire dans une gamme allant de 0 à 100 M $\Omega$ .
- la compensation des courants capacitifs: ces courants résultant de la charge et de la décharge des capacités de la pipette et de la membrane peuvent gêner la mesure d'événements rapides. Deux types de compensations peuvent être réalisés correspondant à des constantes de temps rapides ( $0,2 < \tau < 5 \mu\text{s}$ ) et lentes ( $100 \mu\text{s} < \tau < 10 \text{ms}$ ).

## **3- Le système informatique**

Il est constitué d'un ordinateur couplé à l'amplificateur par l'intermédiaire d'une carte de conversion A/D-D/A (Digidata 1200B, Axon instrument, Foster city, Ca, USA). Le programme de stimulation, l'acquisition des signaux et l'analyse des données sont réalisés par l'intermédiaire du programme pClamp (version 9, Axon Instruments, Foster city, USA).

Le programme Clampex permet de définir les fichiers de stimulation (valeur et du potentiel de repos, durée et amplitude de la stimulation...) et d'acquérir les données.

Le programme Clampfit permet l'analyse des signaux (capacité membranaire, amplitude des courants...).

## **4- Les pipettes**

Le verre choisi pour la fabrication des pipettes est un verre dur en borosilicate d'un diamètre de 1,5 mm (Clark, electromedical instrument, Pangbourne, Angleterre). Les

pipettes de patch sont réalisées par double étirement d'un capillaire en verre dur à l'aide d'une étireuse horizontale (P-97 Flaming/Brown, Sutter instrument company, Novato, Ca, USA). Les réglages de l'étireuse sont tels que la résistance des pipettes fabriquées peut varier de 2 à 4 M $\Omega$ . Les pipettes sont alors remplies d'un liquide intrapipette conducteur. Elles sont fixées sur la tête de l'amplificateur de manière à ce qu'un fil d'Ag/AgCl connecté au convertisseur I/V de la tête de l'amplificateur soit mis en contact avec le liquide intrapipette. Le potentiel est ainsi appliqué entre le fil Ag/AgCl et une électrode de référence placée dans le milieu extracellulaire contenu dans la boîte de pétri.

Le portoir de la pipette est connecté à un tube par lequel est appliquée une surpression ou une dépression dans la pipette.

L'ensemble du dispositif de mesure, ainsi que le microscope inversé repose sur une table antivibratoire et sont placés dans une cage de Faraday (Figure MM 9).

## **5- Solutions expérimentales**

Au cours des expériences de patch, les cellules baignent dans la solution 1 utilisée pour les ensemercer.

La composition des milieux intrapipettes et de perfusion (Tableau MM 10) vise à enregistrer uniquement les courants calciques. Les courants sortants potassiques sont inhibés par la présence d'ions TEA<sup>+</sup> et Cs<sup>+</sup> internes. Les courants entrants sodiques sont bloqués par la présence de tétrodoxtine (TTX) dans le milieu extracellulaire. Du baryum est utilisé à la place du calcium dans les perfusions afin de supprimer les courants sortants résiduels éventuels dépendant du calcium intracellulaire.

Afin de tester les effets de l'OA une solution « mère » est préparée en dissolvant l'OA (Sigma) dans de l'éthanol à 95%. Cette solution est stockée sous atmosphère azotée à -20°C. Au moment de l'expérimentation, l'OA est dilué dans la solution 2 à partir de la solution mère afin d'obtenir la concentration désirée (5, 10, 30, 100  $\mu$ M). La quantité finale d'éthanol présent dans la solution est inférieure à 0,1 %. Afin de s'affranchir des effets potentiels de l'éthanol, la solution de perfusion contrôle contient la même proportion d'éthanol lors de l'expérience que la solution contenant l'OA.

La nifédipine utilisée est dissoute dans du diméthylsulfoxyde ou DMSO (Sigma) à une concentration de 3  $\mu$ M.

**Figure MM 9**

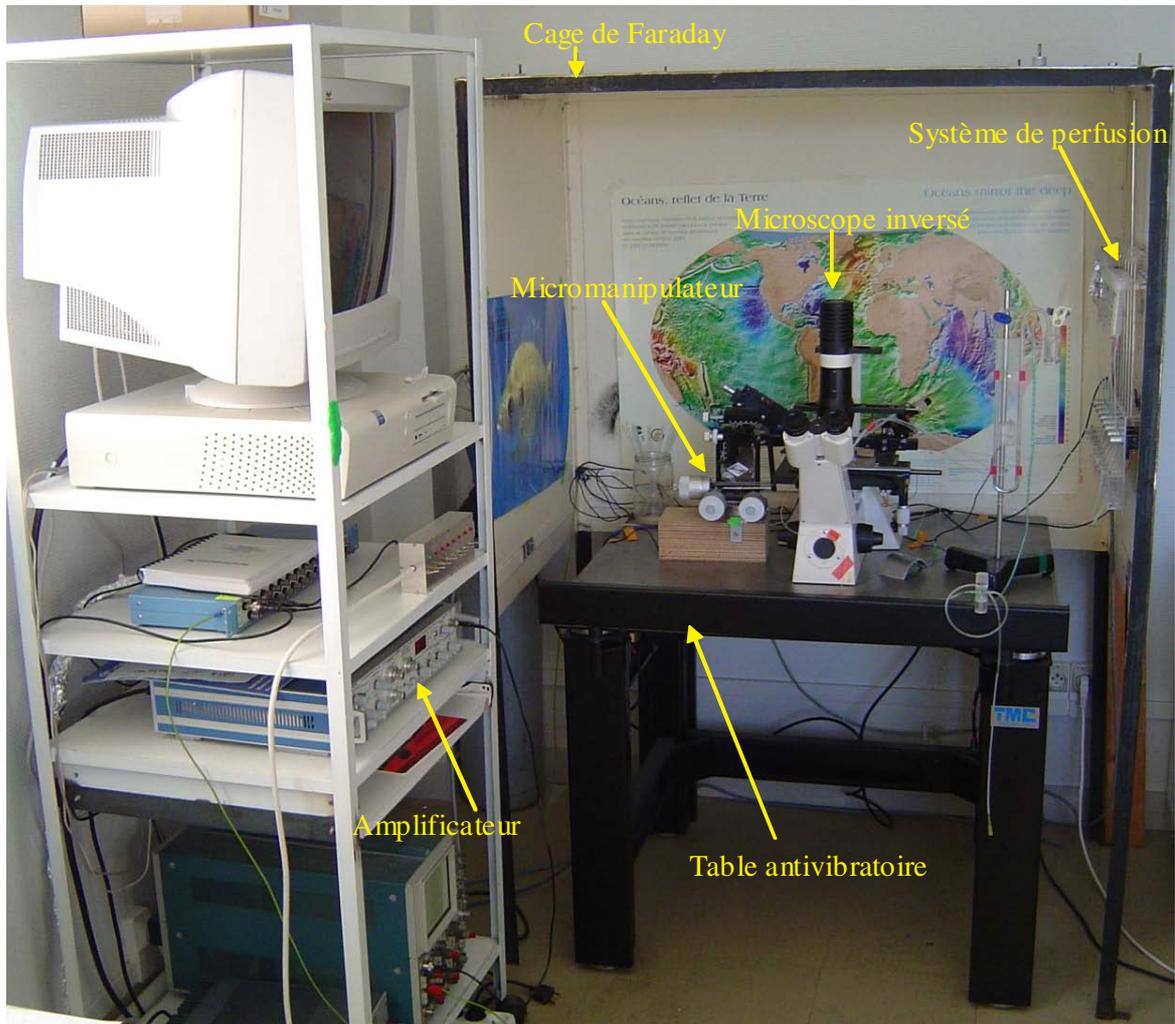


Photo de l'installation de patch-clamp montrant l'ensemble du dispositif expérimental.

**Tableau MM 10**

	Solution intrapipette (mM)	Solution de perfusion (mM)
NaCl	–	130
CsCl	130	5,2
MgCl <sub>2</sub>	1	1
BaCl <sub>2</sub>		5
Oxaloacetate	5	–
Succinate	5	–
MgATP	5	–
TEA-Cl	15	–
EGTA	5	–
Glucose	–	10
Hepes	10	10
TTX	–	0,001
pH	7,2 (CsOH)	7,6 (CsOH)
Osmolarité (mOsm)	280	290

Milieux utilisés pour l'enregistrement du courant baryum en configuration cellule entière.

Les solutions sont perfusées avec un débit de 300  $\mu\text{l. min}^{-1}$  directement sur la cellule étudiée grâce à un système de perfusion contrôlé par électrovanne.

## **C. La procédure technique**

### **1- La configuration «whole-cell recording» (WCR)**

C'est la configuration employée dans cette étude. Elle donne accès à l'activité de tous les canaux situés sur la membrane cellulaire. Les courants enregistrés sont des courants globaux. L'intensité « I » du courant global ou macroscopique moyen provenant d'une population de « N » canaux identiques ayant une probabilité de disponibilité «  $P_n$  » et une probabilité d'ouverture de chaque canal disponible «  $P_o$  », est évaluée selon la formule:

$$I = N \times P_o \times P_n \times i \quad \text{où } i \text{ est le courant passant au travers d'un seul canal.}$$

Le schéma électrique correspondant à cette configuration comprend (Figure MM 11):

- $R_s$ : résistance qui est en série avec la résistance de la pipette ( $R_p$ ) et qui représente la résistance d'accès à la cellule. Elle dépend de la composition du milieu intracellulaire.
- $R_m$ : résistance membranaire qui varie en fonction du type cellulaire concerné.
- la capacité membranaire «  $C_m$  » varie en fonction de la taille de la cellule.

### **2- Mesure de la capacité membranaire**

Lorsque l'on impose un potentiel à une cellule, la membrane se comporte comme une capacité électrique. Le courant charge cette capacité membranaire, ce qui se traduit sur l'enregistrement par un pic de courant capacitif. Ce courant est visible en début et en fin de pulse, correspondant respectivement à la charge et décharge d'un condensateur au travers une résistance. Ces courants capacitifs sont enregistrés lors de la formation du giga seal et augmentent lors de la rupture de la membrane. Les deux structures se comportant comme des condensateurs dans la configuration (WCR), sont les parois de la pipette en verre et la surface totale de la membrane cellulaire. La capacité de la pipette est considérée comme négligeable en configuration WCR. La capacité membranaire peut alors être mesurée en appliquant un saut de potentiel de 10 mV à partir d'un potentiel de référence de - 90 mV.

**Figure MM 11**

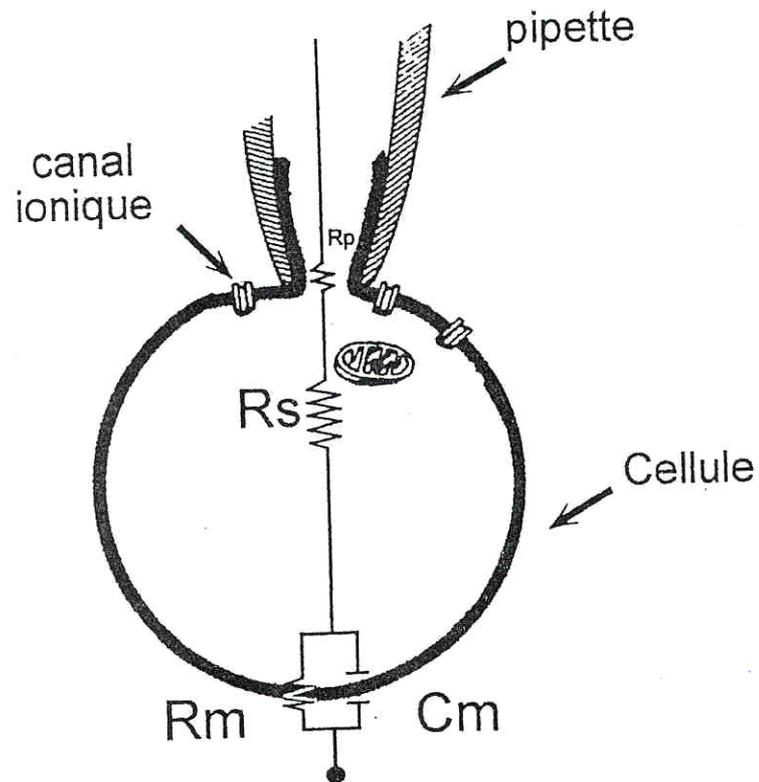


Schéma électrique de la configuration cellule entière. **RS**: résistance série, **Rp**: résistance pipette, **Rm**: résistance membranaire, **Cm**: capacité membranaire.

Ce protocole évite d'activer les courants dynamiques. La capacité est définie comme la quantité de charges  $Q$  (en coulombs) déplacées pour un potentiel donné durant la charge. Cette valeur  $\Delta Q$  est obtenue après intégration, à l'aide du logiciel Clampfit (Pclamp), du pic de courant capacitif enregistré. Le temps de charge de la capacité (caractérisé par une constante de temps  $\tau$ ) ne doit pas être élevé pour permettre une bonne répartition temporelle du potentiel imposé à la cellule.

La capacité membranaire ( $C_m$ ) est calculée par l'équation:

$$C_m = \frac{\Delta Q}{\Delta V}$$

Avec:

- $C_m$ : capacité membranaire (en pF)
- $\Delta Q$ : quantité de charges déplacées (en Cb)
- $\Delta V$ : incrément de potentiel (en mV).

La capacité membranaire ainsi déterminée est directement liée à la surface membranaire. La connaissance de sa valeur pour chaque cellule étudiée permet de normaliser les courants enregistrés en les divisant par la capacité membranaire. On obtient ainsi la densité de courant en pA/pF.

## **D. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont soit réalisées par le test T de Student, soit par une analyse de variance (ANOVA). Une probabilité inférieure à 5 % ( $P < 0,05$ ) représente une différence significative.

# *Chapitre I*

---

Effets des acides gras alimentaires sur les performances cardiaques et respiratoires des bars européens (*Dicentrarchus labrax*)

---

# *Chapitre I-1*

---

Relation entre la composition tissulaire en acides gras et les performances cardiaques et respiratoires des bars européens (*Dicentrarchus labrax*).

---

## **Relation entre la composition tissulaire en acides gras et les performances cardiaques et respiratoires des bars européens (*Dicentrarchus labrax*).**

---

Ce premier sous chapitre est présenté sous la forme d'une publication actuellement en cours d'évaluation par le « Journal of Experimental Biology ». Le manuscrit est précédé d'un bref résumé présentant les principaux résultats de l'étude.

Le bar est un poisson pélagique, migrant dans des eaux côtières et estuariennes (Pickett and Pawson 1994). Au cours de sa vie, la composition de ses prises alimentaires varie mais se compose essentiellement de petits poissons et de crustacés. La disponibilité (qualitative et quantitative) en ressources alimentaires est un facteur environnemental au même titre que la température ou la disponibilité en oxygène. La qualité de l'alimentation, et en particulier sa teneur en acides gras (Ag), est une source de variabilité phénotypique qui touche des traits physiologiques impliqués dans l'adaptation (McKenzie, 2005). Par exemple, une étude de McKenzie et al. (1998) a révélé une relation linéaire positive entre les performances aérobies des saumons Atlantiques (*Salmo salar*) et le taux d'acide oléique dans leurs muscles. Des études *in vivo* et *in vitro* ont également montré que les Ag affectaient les performances cardiaques et respiratoires de poissons comme l'esturgeon, l'anguille ou encore la truite arc-en-ciel (McKenzie et al., 2001, McKenzie, 2005; Agnisola et al., 1996; Paige et al., 1996). Toutefois, il existe des données contradictoires concernant les liens de causalité entre les acides gras et la variabilité physiologique.

L'objectif de notre étude est d'analyser l'impact des taux relatifs d'acide oléique, d'acide linoléique, d'acides gras saturés et d'acide gras poly-insaturés tissulaires sur le métabolisme respiratoire, les performances de nage et cardiaques des bars européens (*Dicentrarchus labrax*). Pour cela, trois lots de poissons ont été nourris pendant quatre mois avec des alimentations, enrichies soit en huile de colza (riche en acide oléique et linoléique), soit en huile de palme (riche en acides gras saturés) soit en huile de foie de

morue (riche en acides gras n-3 poly-insaturés). Les expériences ont été réalisées à 20°C dans un tunnel de nage permettant de mesurer les performances cardiaques et respiratoires des poissons au cours de tests de nage standardisés. Les niveaux relatifs d'acides gras dans les tissus ont été mesurés par chromatographie en phase gazeuse. Dans cette étude l'utilisation d'outils statistiques comme les Analyses à Composantes Principales (ACP) nous a permis d'identifier les liens entre les traits physiologiques et la composition en acides gras des tissus ventriculaires cardiaques.

Cette étude a montré que les changements de composition tissulaire en acides gras avaient des effets significatifs sur les performances de nage, cardiaques et métaboliques des bars. En effet, les bars nourris avec les alimentations les plus riches en acide oléique et linoléique (HC et HP) avaient un débit cardiaque maximal et un registre cardiaque significativement plus élevé que les bars nourris avec l'alimentation HFM. Leur métabolisme actif, leur registre métabolique aérobie ainsi que leur vitesse de nage maximale étaient également plus élevés chez les poissons nourris avec les alimentations HC et HP. En ce qui concerne les valeurs basales, aucune différence significative n'a été observée pour la SMR ou le débit cardiaque entre les trois alimentations. L'utilisation d'ACP a permis de révéler une corrélation significative d'une part les performances de nage, métaboliques et cardiaques et d'autre part les taux d'acide oléique et linoléique dans le tissu cardiaque.

**Associations between tissue fatty acid composition and physiological traits of performance and metabolism in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*).**

A. Chatelier<sup>1\*</sup>, D.J. McKenzie<sup>1</sup>, A. Prinet<sup>1</sup>, R. Galois<sup>1</sup>, J. Robin<sup>2</sup>, J. Zambonino<sup>2</sup> and G. Claireaux<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherche sur les écosystèmes Marins et Aquacoles, Place du séminaire, BP 5, 17137 L'Houmeau, France.

<sup>2</sup> Unité mixte Nutrition, Aquaculture, Génomique Inra-Ifremer-Bordeaux 1, Laboratoire Adaptation Reproduction Nutrition des Poissons, Ifremer, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France.

\*Corresponding author: [aurelien.chatelier@univ-lr.fr](mailto:aurelien.chatelier@univ-lr.fr), Tel/Fax, +33 (0)5 46 50 02 94.

**Abstract**

Seabass were fed for four months with diets where the lipid was provided as either canola oil (CO), palm oil (PO) or fish oil (FO), to generate diversity in their tissue fatty acid (FA) composition and investigate how this influenced major traits of exercise performance, cardiac performance and respiratory metabolism. In particular, based upon previous observations, we investigated the hypothesis that enriching the fish tissues with oleic and linoleic acids (18:1n-9 and 18:2n-6, respectively) from CO would improve maximum exercise and cardiac performance, and increase aerobic metabolic scope. Exercise respirometry on bass fitted with cardiac flow probes revealed that those fed the CO and PO diets had a significantly higher critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) than those fed the FO diet. The improved swimming performance in the CO and PO groups was accompanied by a higher maximum cardiac output (Q) and net cardiac scope, and a higher active metabolic rate (AMR) and aerobic scope (AS) than in the FO group. Analysis of tissue FA composition revealed that the fish fed the CO and PO diets had accumulated significantly higher levels of oleic and linoleic acids in their heart and muscle than the fish from the FO group, which had significantly higher levels of highly unsaturated FA of the n-3 series, such as EPA and DHA (20:5n-3 and 22:6n-3, respectively). Principle components analysis revealed significant positive associations between tissue oleic and linoleic acid content and  $U_{crit}$ , maximum Q, cardiac scope, AMR and aerobic scope. There was a negative association between these physiological traits and tissue content of EPA. Therefore, diet composition is an environmental factor that can generate significant phenotypic diversity in major physiological traits of performance and metabolism in the sea bass, with increased intake of FAs such as oleic and linoleic acids leading to improved cardiorespiratory performance.

Key words: sea bass, swimming, metabolism, cardiovascular performance, fatty acid, diet.

## **Introduction**

The ability to move is a fundamental property of animal life and, although not yet proven, logic dictates that the ability to swim should factor into the Darwinian fitness of many fish species. The study of exercise performance in fishes has a long history but, to date, most work has focused on investigating the mechanisms contributing to propulsion (e.g. Webb, 1993; 1998; Videler, 1993), the energetics of activity metabolism (e.g. Beamish, 1978; Jones and Randall, 1978; Webb, 1993), and the use of locomotor capacity as a gauge of fish stress level and/or water quality (e.g. Jain *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 2003a). It is generally assumed that swimming performance will be critical to the success of individual fish, but intra-specific diversities in performance, and the potential sources of such diversity, have received little attention (reviewed in Kolok, 1999; Plaut, 2001; Nelson *et al.* 2002) despite the fact that this is the raw material upon which natural selection will act. Clearly, individual physiological diversity may have genetic or environmental origins but, at present, we have little understanding of the relative contributions from each of those sources.

One environmental factor that is emerging as a significant source of physiological diversity in fish is diet quality, and particularly the relative intake and subsequent tissue accumulation of certain fatty acids (FA; Tocher, 2003; McKenzie, 2005). McKenzie *et al.* (1998) found a direct positive relationship between the sustained aerobic exercise performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their muscle levels of oleic acid (OA; 18:1n-9) and linoleic acid (LA; 18:2n-6). On the other hand, highly unsaturated FA of the n-3 series (n-3HUFA), namely EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3), have also been reported to have beneficial effects upon the exercise performance of Atlantic salmon (Wagner *et al.*, 2004). Indeed, these same n-3HUFA have a number of effects upon the cardiorespiratory

physiology of fish (McKenzie, 2001; 2005) that might impinge upon aerobic exercise performance. When compared with individuals fed a diet rich in saturated fatty acids (SFA, such as 14:0 and 16:0), whole-animal metabolic oxygen demand (standard and routine metabolic rates) was significantly lower in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and European eels (*Anguilla anguilla*) fed a diet rich in n-3 HUFA (McKenzie, 2001). Furthermore, *in vitro* experiments have demonstrated that hearts from the sturgeon fed the diet enriched in SFA were unable to maintain performance when oxygen supply was reduced, unlike hearts from sturgeon fed the n-3HUFA (Agnisola *et al.*, 1996). These relative effects of SFA and n-3HUFA might influence aerobic swimming ability if changes in standard and routine metabolic rates influence metabolic scope for aerobic activities (Fry, 1971). Moreover, because the myocardium is a predominantly aerobic muscle, cardiac performance is believed to be one of the major factors underlying aerobic exercise capacity in active teleosts (Farrell, 1997; 2002; Claireaux *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2005).

The objective of the current study was, therefore, to investigate how the relative tissue levels of OA, LA, SFA and n-3HUFA influenced traits of exercise performance, *in vivo* cardiac performance and respiratory metabolism in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Sea bass are active predatory teleosts that feed primarily upon smaller fish and crustaceans, which they capture by pursuit (Pickett & Pawson 1994). Young stages are subject to predation by pelagic fishes and several species of bird (Pickett & Pawson, 1994). The species is profoundly euryhaline (Chatelier *et al.*, 2005) and performs substantial migrations, colonising environments ranging from oceanic off shore waters to inshore, freshwater-exposed estuaries and coastal lagoons (Pickett and Pawson 1994). Thus, exercise ability should be a correlate, and a predictor, of the fitness of an individual seabass in its natural environment. The different environments colonised by bass will possess different foodwebs and so provide different diets to the fish. Indeed, the

availability of particular fatty acids (in particular n-3HUFA and LA) can display large spatial and seasonal fluctuations between, for example, estuarine versus coastal marine foodwebs (Galois *et al.*, 1996).

Three groups of fish were fed for 4 months with three different diets, enriched in either CO (rich in OA and LA), PO (rich in SFA), or FO (rich in n-3HUFA). Exercise respirometry and cardiac flow probes were then employed to measure a suite of physiological traits of metabolism and performance. These dietary oils provide a complex mixture of FA alongside the specific ones of interest. Therefore, tissue levels of FA and the suite of traits were all measured upon the same fish, such that principle components analysis could be performed to highlight associations between physiological traits and specific FA in the tissues. We investigated the hypothesis that the best exercise performance would be measured in fish with tissues rich in OA and LA, followed by those with tissues rich in n-3HUFA (from fish oil) and the worst performance would be in the fish fed SFA (from palm oil), who would also have elevated rates of standard metabolism. We also investigated the hypothesis that improved exercise performance in seabass with tissues rich in OA and LA would be linked to greater aerobic metabolic scope and *in vivo* cardiac performance.

### **Materials and methods**

All experiments were performed at CREMA, l'Houmeau (France).

#### ***Experimental diets***

The experimental diets were prepared at the “Centre de Nutrition des Poissons” (IFREMER, Brest, France) as 4.5 mm pellets. The basal composition of these diets was identical except that dietary lipids were provided as either canola oil (CO), palm oil (PO) or fish (cod liver) oil (FO). Fatty acid composition of the experimental diets reflected their

supplementation with either CO, PO, or FO (table 1). Thus, compared with the other two, the canola oil diet was richer in OA and LA, the palm oil diet contained these FA but also high levels of palmitic acid (16:0), while the fish oil diet provided high levels of EPA and DHA.

### ***Experimental animals and feeding***

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with a mean ( $\pm$  SD) mass of  $200 \pm 10$  g and length of  $26.56 \pm 0.28$  cm were obtained from a commercial supplier on Ile de Ré (Charente Maritime, France). They were maintained at CREMA in 1 m<sup>2</sup> fibreglass tanks (water volume approximately 400 L) under a natural photoperiod. Tanks were provided with biofiltered seawater (SW) at a temperature of 20 °C and salinity of 30‰. A total of 72 fish were slightly anaesthetised, fitted with a subcutaneous passive integrated transponder (PIT) tag for individual identification, then allocated randomly to one of 6 experimental groups (2 replicates per diet, 12 individuals per replicate). Following a 1-month acclimation period, during which they were fed with a commercial diet (Bar D PerformNatura 4.5; Sica du Gouessant, Lamballe, France), fish were fasted for two weeks prior to the beginning of the feeding protocol. Fish were then fed daily to satiation, with their designated experimental diet. After 4 months, the time necessary for the fish to double their weight, daily growth and Fulton's index were calculated:

$$\text{Daily growth} = \frac{\frac{fW - iW}{iW} \times 100}{n},$$

$$\text{Fulton's index} = \frac{fW}{L^3} \times 100$$

where *fW* is final weight in Kg, *iW* is initial weight in Kg, *n* is the number of feeding days and *L* is length in cm.

### ***Surgical preparation***

At this stage of the experiment, bass with a mean mass and forklength of  $395 \pm 10$  g and  $30.58 \pm 0.28$  cm, respectively, were anaesthetised with tricaine methane sulphonate (MS-222) at a concentration of  $0.1\text{g L}^{-1}$ , and transferred to an operating table where their gills were irrigated with aerated water containing  $0.05\text{g L}^{-1}$  MS-222. A 2S-type Transonic (EMKA, Paris, France) ultrasound flow probe (resolution  $0.1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; absolute accuracy  $\pm 15\%$ ) was placed around the ventral aorta, as described by Axelsson *et al.* (2002). Following surgery, the animals were allowed 48 h recovery in opaque PVC chambers provided with a flow of water.

### ***Exercise and cardiac performance***

Swimming respirometry was performed with an automated Brett-type swim-tunnel respirometer designed to exercise fish in a non-turbulent water flow with a uniform velocity profile (McKenzie *et al.*, 2001). Fish were transferred individually to the respirometer and allowed to recover for at least 12 hours (overnight) at a current speed of  $0.5\text{ bodylengths}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$ ). At this low current speed bass rested on the bottom and maintained position by very gentle sculling of their pectoral fins and occasional tail flicks. The following day, fish were exposed to progressive increments in swimming speed, every 30 min, until fatigue. The different speeds used were 0.5, 1, 2, 3, 3.5 and  $4\text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ . Fish were considered to be fatigued when they were unable to remove themselves from the posterior screen of the swimming chamber despite gentle encouragement by sudden increases in current velocity. Measurements of  $\text{O}_2$  uptake ( $M_{\text{O}_2}$ , in  $\text{mg kg}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) were collected automatically at each swimming speed with the custom-designed data-acquisition system described in McKenzie *et al.* (2001) and custom-made software (G. Guillou, CREMA L'Houmeau). Water  $\text{O}_2$  saturation in the sealed respirometer was measured with an Orbisphere clarke-type polarographic oxygen electrode and associated meter

(Orbisphere Laboratory, Geneva, Switzerland). The measurements of  $M_{O_2}$  during exercise were used to derive the notional metabolic rate of the immobile fish (IMR), as described by McKenzie *et al.*, (2003b). The maximum metabolic rate of activity (AMR) was identified during swimming (this occurred at speeds approaching  $U_{crit}$ ) and used to calculate net aerobic scope relative to IMR (McKenzie *et al.*, 2003b). Critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) was calculated in  $BL \cdot s^{-1}$  as described by Brett (1964).

At each swimming speed, cardiac output ( $Q$ ) was measured in  $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$  with the signal from the flowprobe displayed on the Transonic amplifier and acquired by a PC with the custom-designed labview software described in Axelsson *et al.* (2002). The signal was used to calculate  $f_H$  in  $beats \cdot min^{-1}$  and, together with the data for  $Q$ , used to calculate  $V_{SH}$ , in  $ml \cdot beat^{-1} \cdot kg^{-1}$ . Cardiac scope during exercise was calculated as maximum  $Q$  minus “routine”  $Q$ . Maximum  $Q$  always occurred at swimming speeds approaching  $U_{crit}$ , routine  $Q$  was taken as the lowest  $Q$  measured when the fish was swimming very gently at a speed of  $5 \text{ cm s}^{-1}$ , prior to the exercise protocol. Routine  $f_H$  and  $V_{SH}$  were derived from the measures of routine  $Q$ . Increase in  $f_H$  and  $V_{SH}$  during exercise was calculated respectively as maximum  $f_H$  minus routine  $f_H$  and maximum  $V_{SH}$  minus routine  $V_{SH}$ .

After experiments, animals were rapidly removed from the respirometer and killed with a blow to the head. The ventricle and a piece of white muscle were taken and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until fatty acids analysis.

### ***Tissues fatty acid analysis***

#### *Total lipid extraction and measurement:*

Lipids were extracted from tissues following a procedure derived from that of Folch *et al.* (1957). A double step extraction was carried out on rehydrated samples by grinding them in chloroform: methanol mixtures (1:2 then 2:1, v/v) with an all-glass Potter homogeniser. For each sample, the two homogenates were filtered on GF/F pre-combusted filters and

pooled in a conical glass centrifuge tube. Following the addition of a 1% NaCl solution, the crude extract separated into two phases. After decantation, the lower phase containing lipids was recovered by suction and stored in PTFE capped glass tubes at -20°C until analysed.

Total lipids were measured with a Chromarod SIII - Iatroscan TH-10 system (TLC-FID) connected to a Shimadzu CR3A integrator. For each sample, four successive volumes (1 µl) of a concentrated extract aliquot were spotted on a Chromarod with a 2 µl microsyringe. After drying in a dessicator, the rod was read directly by the Iatroscan without any development. A calibration curve based on a mixture of pure standards (Sigma) was used to calculate the total lipid concentration of the lipid extracts (Parrish & Ackman, 1985).

*Separation of polar lipids from neutral lipids*

Total lipids were separated into neutral and polar fractions by using an HPLC equipment (Kontron Analytical) coupled with an ELSD-500 detector (Alltech). The separation was carried out on a preparative 50 mm x 10 mm ID stainless steel column filled with an SPE Si-diol phase (IST). The polarity gradient was obtained with increasing proportions of methanol in chloroform. The column effluent was by-passed in such a way that 90% of the separated lipid fractions were recovered for FAME analyses, while the detector measured 10%.

*FAME preparation, purification and measurement:*

Fatty acid methyl esters (FAME) from the polar lipid fraction were obtained after a base-catalysed transesterification with sodium methylate (0.5 M, 1 h, 80°C; Christie, 1984).

FAME were purified by HPLC, using a preparative 100 mm x 10 mm ID stainless steel column filled with an SPE Si-NH<sub>2</sub> phase (IST). The polarity gradient was obtained by increasing the proportions of chloroform and methanol in heptane. As above, the column

effluent was by-passed so that 90% of the purified FAME was recovered for gas chromatography, while the detector measured 10%.

Purified FAME were then analysed by gas chromatography (Packard 439) on a SGE BPX-70 highly polar capillary column (30 m x 0.25 mm ID x 0.25  $\mu\text{m}$  film), with hydrogen as carrier gas at 1.1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . The temperature gradient ran from 90 to 210°C at a rate of 1°C $\cdot\text{min}^{-1}$ . Identification of FAME was completed by comparison with pure individual standards (Sigma), standard mixtures (Supelco) and hydrogenated samples.

### ***Statistical analysis***

Differences amongst the dietary groups for any given variable were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA). Links between heart polar lipids and physiological traits were explored by Principal Component Analysis (PCA) followed by Pearson correlation tests, using StatBox6<sup>®</sup> software. Only FA that represented more than 1% of total tissue FA were used for the PCA and Pearson correlation tests. A probability of less than 5% ( $p < 0.05$ ) was taken as the fiducial level for statistical significance.

## **Results**

After the 4-month feeding period, there was no significant difference in mean ( $\pm$  SEM) specific growth rate between the three experimental groups, when calculated as the daily percentage increase in mass. Thus, SGR was  $0.31 \pm 0.03$ ;  $0.36 \pm 0.03$ , and  $0.51 \pm 0.10$   $\% \cdot \text{day}^{-1}$  in the CO, PO and FO groups, respectively. The Fulton's index did not differ between the groups either, being  $1.36 \pm 0.02$ ;  $1.33 \pm 0.03$ , and  $1.46 \pm 0.04$   $\% \cdot \text{day}^{-1}$  in the CO, PO and FO groups, respectively.

---

*Exercise and cardiac performance*

Sea bass fed the CO and PO diets achieved a mean ( $\pm$  SEM)  $U_{\text{crit}}$  of  $3.2 \pm 0.04$  and  $3.24 \pm 0.05$  BL.s<sup>-1</sup>, respectively, which were not significantly different (Fig. 1). In contrast, fish fed FO only achieved a  $U_{\text{crit}}$  of  $2.93 \pm 0.12$  BL.s<sup>-1</sup>, which was significantly lower than the other two groups.

IMR was not significantly different between diets (Fig 2A) but there were significant differences in respiratory metabolism during exercise. Exercise elicited an exponential increase in  $MO_2$  (data not shown) until a plateau was reached just prior to fatigue ( $U_{\text{crit}}$ ). As shown in Fig. 2B, AMR was significantly higher in the CO and PO groups relative to the FO group. As a direct consequence, net aerobic scope was also significantly higher in the CO and PO groups, relative to the FO group (Fig 2C).

There was no significant difference in routine  $Q$  between diets (Fig 3A), nor in routine  $V_{\text{SH}}$  and  $f_{\text{H}}$  (Table 2). There were, however, differences in the cardiac response to exercise. As shown in Fig 3B, maximum  $Q$  was significantly higher in CO and PO fish than in those from the FO group. As a consequence, net cardiac scope was also significantly higher for CO and PO fish (Fig 3C). In all fishes, the increased  $Q$  during exercise was primarily a consequence of increased  $f_{\text{H}}$ , with a smaller contribution from increases in  $V_{\text{SH}}$  (Table 2), but there were no differences in the maxima for these two variables amongst the three diets (Table 2).

*Tissue FA composition*

As anticipated, there was a clear influence of dietary FA composition upon tissue FA profile, with cardiac and muscle polar lipid contents reflecting the composition of the diets (Table 3). Tissues of the CO fish had a significantly higher level of OA and LA than the FO fish, although PO animals also had high levels of these particular FA (Table 3). Muscle

of fish fed the PO diet had a significantly higher level of SFA, particularly palmitic acid, than the other two diets. On the other hand, the n-3HUFA EPA and DHA were significantly higher in muscle polar lipids of the FO fish as compared to the other two diet groups (Table 3). The EPA content of heart polar lipids was also significantly higher for FO fish when compared to the other two diets, but this was not true of DHA (Table 3).

*Principal component analysis*

The PCA demonstrated a clear separation between the different fish groups, with a number of opposing trends in the distributions of heart FA composition versus the measured physiological traits (fig 4). The CO and PO fish were localised to the right side of the horizontal axis 1, opposite to the FO fish which distributed to the left. On that axis, the distribution of the CO and PO fish was towards high values for tissue OA, tissue LA,  $U_{crit}$ , AMR, net aerobic scope, maximum  $Q$ , cardiac scope, maximum  $f_H$ , scope for  $f_H$ , and maximum  $V_{SH}$ . The FO fish were distributed towards low values for all of these traits but, conversely, high values for Fulton's index, daily growth rate and the two n-3HUFA, EPA and 22:5n-3. These distributions are reflected in the Pearson correlations derived from the PCA, shown in Table 4. Thus, high tissue levels of OA and LA were significantly and positively correlated with  $U_{crit}$ , AMR, net aerobic scope and cardiac scope. On the other hand, high tissue levels of EPA and 22:5n-3 were negatively correlated with  $U_{crit}$ , AMR and net aerobic scope but positively correlated with Fulton index and daily growth rate. The PCA and Pearson correlations also revealed significant associations between tissue FA and other physiological traits, which distributed along the vertical axis 2 (figure 4, Table 4). At the top of this axis, high tissue levels of the SFA 16:0 and 18:0 were associated with high values for IMR and routine  $f_H$  (figure 4). At the opposing end of this axis, high tissue levels of DHA and the n-6HUFA 20:4n-6 were associated with low values for these two

physiological traits. There was a significant positive Pearson correlation between 16:0 and IMR and an opposing significant negative association between DHA and IMR (Table 4).

## **Discussion**

The results demonstrate that diet-related changes in the FA composition of the tissues can have significant effects upon major physiological traits of performance and metabolism in the seabass. This overall result is consistent with previous studies showing an impact of tissue FA composition on the cardiorespiratory physiology of fish (Randall *et al.*, 1992; McKenzie *et al.*, 1995; 1997; 1998; 2000; Agnisola *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 2004). Despite our expectations, however, the poorest performance was not in fact observed in the fish fed the PO diet, rich in SFA, but in the fish fed the FO diet, rich in n-3HUFA. This may be partially because the PO diet also provided OA and LA, which were linked to improved physiological performance. Indeed, the results of the PCA allowed us to identify associations between specific FAs in the tissues and particular physiological traits of metabolism and performance.

The significantly higher  $U_{crit}$  measured in the CO and PO groups, as compared to the FO group, can be attributed to the high levels of OA and LA in their tissues. These results are consistent with a previous study on Atlantic salmon (McKenzie *et al.*, 1998) which found that incremental substitutions of fish oil by canola oil in the dietary lipids led to incremental increases in swimming performance, with a direct positive relation between tissue OA and LA (derived from the dietary canola oil) and  $U_{crit}$ . The current data extend these observations to demonstrate that improved exercise performance was linked to higher active metabolic rates and aerobic scope in fish with tissues rich in OA and LA. Furthermore, this improvement to maximum respiratory performance was, in turn, associated with improved maximum cardiac performance.

It is not clear to what extent the greater aerobic scope and higher swimming performance of the CO and PO fish might have been dependent upon the improved cardiac performance. It has been argued that aerobic myocardial performance may be a primary factor limiting AMR and  $U_{crit}$  in active teleosts (Farrell, 2002; Claireaux *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2005). A recent study has demonstrated that intrinsic diversities in maximum  $Q$  are directly linked to parallel diversities in AMR, aerobic scope and  $U_{crit}$  in rainbow trout (Claireaux *et al.*, 2005). This linkage has yet to be demonstrated for seabass, but there is some evidence for a role of cardiac performance in defining aerobic scope and  $U_{crit}$ . In many active teleost, including rainbow trout, both  $Q$  and  $M_{O_2}$  plateau as fish approach  $U_{crit}$  in swim tests (Kiceniuk and Jones, 1977; Kolok and Farrell 1994; Thoraresen *et al.*, 1996; Gallagher *et al.*, 2001; Chatelier *et al.*, 2005) and this has been taken as circumstantial evidence that it is limitations to cardiac work that are constraining aerobic scope (Farrell, 2002). This simultaneous plateau of both  $Q$  and  $M_{O_2}$  occurs in seabass (Chatelier *et al.*, 2005) and corresponds with the initiation of an intermittent “burst and coast” swimming pattern that indicates recruitment of anaerobic white muscle (Day and Butler, 1996) and which precedes fatigue. Visual observation of the ventral aortic probe trace at this time of the experiment also revealed significant cardiac arrhythmias, further circumstantial evidence that impaired cardiac performance was linked to the onset of fatigue. This arrhythmia always occurred at higher swimming speeds in the CO and PO fish, when compared to the FO animals.

At present, it is only possible to speculate about the mechanism by which the tissue OA and LA might exert their effects upon cardiorespiratory performance. They may be related to the fact that aerobic metabolism, and aerobic work, is fuelled primarily by  $\beta$ -oxidation of FA in fish (Hochachka and Somero, 1984; Richards *et al.*, 2002). There is *in-vitro* evidence to suggest that OA and LA are preferred over other FA, especially HUFA,

as substrates for  $\beta$ -oxidation (Sidell and Driedzic, 1985; Henderson and Sargent, 1985; Egginton, 1996). It is conceivable, therefore, that higher levels of these preferred substrates in the tissues might allow the animals to achieve higher rates of aerobic work (McKenzie, 2001). The effects of OA and LA on cardiac function may also be linked to a role of FA in membrane processes. Studies on isolated mammalian cardiomyocytes revealed that extracellular application of EPA and other PUFA produced a prompt and reversible concentration-dependent inhibition of the L-type calcium current, thereby limiting calcium entry into the cells (Xiao *et al.*, 1997; Leaf *et al.*, 1999). It was proposed that such effects should protect against calcium overload and arrhythmia (Xiao *et al.*, 1997; Leaf *et al.*, 1999). Any such beneficial effect of EPA on cardiac arrhythmia was not revealed in our study. There is, however, preliminary evidence to indicate that OA has an inhibitory effect on L-type calcium channels and could, therefore, protect hearts against arrhythmia (A. Chatelier, unpublished observations). Such an effect might have contributed to the improved cardiac performance in the CO and PO fish.

The relatively poorer performance of the seabass with tissues rich in EPA is also consistent with previous results of McKenzie *et al.* (1998) on Atlantic salmon. These results are, however, in direct contrast to those reported by Wagner *et al.* (2004), who found improved exercise performance in salmon fed a diet rich in n-3HUFA. The explanation for these opposing results presumably lies in the enormous complexity of factors within such diet studies. In particular, the oils used in dietary studies all provide a complex mixture of FA. Many of these FA have specific biological roles that interact with each other (Sargent *et al.*, 1999), such that each study is effectively unique unless great care is taken to match the ingredients. There may also be minimum threshold of action for some FA. The biomedical literature provides many similar examples of studies with

contrasting results for the effects of particular FA upon physiological traits, including for cardiovascular traits with important clinical significance.

In the current study, the relatively poor performance of fish with tissues rich in EPA should not be taken as an indicator of overall “reduced fitness”, since tissues rich in this FA were correlated positively with high fish growth rates. It is interesting that the PCA revealed that these effects were correlated with EPA (and its elongation product 22:5 n-3) rather than DHA, the other essential n-3HUFA provided in the FO diet. It is also interesting that it was high tissue levels of DHA, not EPA, that were correlated with low IMR in the PCA. The opposing effects of DHA versus SFA upon IMR, revealed in the PCA and Pearson correlations, are consistent with previous studies (McKenzie *et al.*, 1997; 2000) where sturgeon and eels fed n-3HUFA had significantly lower rates of metabolism than those fed SFA. The current results indicate that this may have been due to an action of DHA. The absence of a significant difference in IMR amongst the FO and PO groups, when assessed by ANOVA, may reflect the presence of high levels of OA and LA in the PO diet (the studies on sturgeon and eels by McKenzie *et al.* (1997; 2000) used hydrogenated coconut oil, composed entirely of SFA). The ability of the PCA to identify correlations between physiological traits and tissue levels of specific FA (in this case EPA versus DHA) may provide a means of exploring the relative effects of FA in complex mixtures, and therefore of reconciling apparently contrasting results.

Once again, it is only possible to speculate about the mechanism(s) for the effects on metabolic rate of DHA versus SFA (McKenzie, 2001). Hulbert and Else (1999) and Hulbert *et al.* (2005) suggest that effects of n-3HUFA versus SFA on metabolic rate are due to membrane-related processes and particularly to differences in energy consumption by membrane-bound ATPases. These authors hold that these differences are consequent to changes in membrane FA composition and physico-chemical properties (Hulbert and Else,

1999; Hulbert *et al.*, 2005). These authors, however, report that n-3HUFA actually raise metabolic rate, while SFA lower it, in a number of terrestrial endotherms (birds and mammals). This is exactly opposing to the effects on metabolic rate reported here and previously by McKenzie *et al.* (1997; 2000). Once again, the basis for such contrasting results is not clear, although they may reflect differences in metabolic regulation between terrestrial endotherms and aquatic poikilotherms. Interestingly, Pepe and MacLennan (2002) reported that hearts isolated from rats fed with n-3HUFA (from fish oil) had significantly lower rates of myocardial oxygen consumption than hearts from rats fed SFA (from coconut oil). They attributed this to differences in mitochondrial membrane composition that influenced proton leak (Pepe and MacLennan, 2002). Thus, while there can be no doubt that dietary FA exert profound effects upon the metabolic and cardiorespiratory physiology of vertebrates, further work is needed to explore the mechanisms for these effects and, thereby, hopefully to explain the plethora of contrasting results.

In the present study at 20°C, sea bass exhibited a much greater AMR, aerobic scope, maximum  $Q$  and  $U_{crit}$  than the sea bass at 15°C studied by Chatelier *et al.* (2005). This demonstrates that temperature exerts a profound effect upon the cardiorespiratory performance of seabass (Claireaux *et al.*, unpublished observations). Similarly to a previous study (Chatelier *et al.*, 2005) the increase in  $Q$  during exercise was attributable to an increase in  $f_H$  rather than  $V_{SH}$ . Chatelier *et al.* (2005) found that rapid changes in water salinity had no effect on cardiac or swimming performance. Thus, diet would appear to be at least as important an environmental variable as salinity for defining the performance of seabass in their natural environment. Migrations of sea bass may expose the animals to entirely different FA availabilities, particularly between marine foodwebs that are rich in n-3HUFA and estuarine foodwebs where FA such as LA and OA may be more common.

Inter-annual variation in recruitment is a puzzling question that fisheries have been faced with for many years. Knowledge of the environmental factors that contribute to fitness would vastly improve management models and should be an important element of any ecosystem approach to fisheries management. In that context, establishing the link between fish physiological performance and nutrient availability or quality may contribute to understanding the relationship between adult biomass and ensuing recruitment.

### **Acknowledgements**

AC was funded by a doctoral fellowship from IFREMER and the “Conseil Régional Poitou-Charentes”. DJM contributed to this study while employed upon the EU project Ethofish. The authors are grateful to G. Guillou, P. Pineau and M. Prineau for their assistance.

### **References cited**

- Agnisola, C., McKenzie, D. J., Taylor, E. W., Bolis, C. L. and Tota, B.** (1996). Cardiac performance in relation to oxygen supply varies with dietary lipid composition in sturgeon. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **271**, 417-425.
- Axelsson, M., Altimiras, J., and Claireaux, G.** (2002). Post-prandial blood flow to the gastrointestinal tract is not compromised during hypoxia in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. exp. Biol.* **205**, 2891-2896
- Beamish, F. W. H.** (1978). Swimming capacity. In: *Fish Physiology*, vol. VII (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 101–187. New York: Academic Press.
- Brett, J. R.** (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **21**, 1183-1226
- Chatelier, A. C., McKenzie, D. J. and Claireaux, G.** (2005). Effects of changes in water salinity upon exercise and cardiac performance in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biol.* **147**, 855-862.

- Christie, W. W.** (1984). Extraction and hydrolysis of lipids and some reactions of their fatty acid components. In: *Handbook of Chromatography, Lipids, Vol.1* (ed. G. Zweig and J. Sherma), pp. 33-46, Boca Raton, CA: CRC Press Inc.
- Claireaux, G., McKenzie, D. J., Genge, A. G., Chatelier, A., Aubin, J. and Farrell, A. P.** (2005). Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **208**, 1775-1784.
- Clark, T. D., Ryan, T., Ingram, B. A., Woakes, A. J., Butler and Frappell, P. B.** (2005). Factorial aerobic scope is independent of temperature and primarily modulated by heart rate in exercising murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Physiol. Biochem. Zool.* **78**, 347-355.
- Day, N. and Butler, P. J.** (1996). Environmental acidity and white muscle recruitment during swimming in the brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.* **199**, 1947-59.
- Egginton, S.** (1996). Effect of temperature on optimal substrate for  $\beta$ -oxidation. *J. Fish. Biol.* **49**, 753-758.
- Farrell, A. P.** (1997) Effects of temperature on cardiovascular performance. In: *Global warming: implications for freshwater and marine fish* (ed. C. M. Wood and D. G. McDonald), pp. 135–158. Cambridge: Cambridge University Press.
- Farrell, A. P.** (2002). Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **132.A**,797-810.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *JBC* **226**, 497-509.
- Fry, F. E. J.** (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. In: *Fish physiology* (ed. W. S. Hoar & D.J. Randall), pp. 1–98. London: Academic Press.

- Gallaugher, P. E., Thorararansen, H., Kiessling, A. and Farrell, A. P.** (2001). Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transfer and osmotic balance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. *J. exp. Biol.* **204**, 2861-2872.
- Galois, R., Richard, P. and Fricourt, B.** (1996). Seasonal variations in suspended particulate matter in the Marennes-Oleron Bay, France, using lipids as biomarkers. *Estuarine-coastal-and-shelf-science* **43.3**, 335-357.
- Henderson, R. J. and Sargent, J. R.** (1985). Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **82.B**, 79-85.
- Hochachka, P. W. and Somero, G. N.** (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton: Princeton University Press.
- Hulbert, A. J. and Else, P. L.** (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* **199**, 257-274.
- Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, N. L. H. and Else, P. L.** (2005). Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev.* **80**, 155–169.
- Jain, K. E., Birtwell, I. K. and Farrell, A. P.** (1998). Repeat swimming performance of mature sockeye salmon following a brief recovery period: a proposed measure of fish health and water quality. *Can. J. Zool.* **76**, 1488-1496.
- Jones, D. R. and Randall, D. J.** (1978). The respiratory and circulatory systems during exercise. In: *Fish Physiology, vol. VII* (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 425–501. New York: Academic Press.
- Kiceniuk, J. W. and Jones, D. R.** (1977). The oxygen transport system in trout (*Salmo gairdneri*) during sustained exercise. *J. Exp. Biol.* **69**, 247-260.

- Kolok A. S. and Farrel A. P.** (1994). Individual variation in the swimming performance and cardiac performance of northern sawfish, *Ptychocheilus oregonensis*. *Physiol. Zool.* **67**, 706-722.
- Kolok, A. S.** (1999). Inter-individual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and a brief review of the recent fish literature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56**, 700-710.
- Leaf, A., Kang, J. X., Xiao, Y-F., Billman, G. E. and Voskuyl, R. A.** (1999). The antiarrhythmic and anticonvulsant effects of dietary N-3 fatty acids. *J. Membrane Biol.* **172**, 1-11.
- McKenzie, D. J.** (2001). Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **128.A**, 607-621.
- McKenzie, D.J.** (2005). Effects of dietary fatty acids on the physiology of environmental adaptation in fish. In: *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (ed. J.M. Starcke and T. Wang), pp. 363-388. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- McKenzie, D. J., Cataldi, E., Owen, S., Taylor, E. W. and Bronzi, P.** (2001). Effects of acclimation to brackish water on the growth, respiratory metabolism and exercise performance of Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**, 1104-1112.
- McKenzie, D. J., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., Deacon, G. and Randall, D. J.** (1998). Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Fish Physiol. Biochem.* **19**, 111-122.
- McKenzie, D. J., Martinez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E. W., Steffensen, J. F. and Estrada, M. P.** (2003b). Effects of growth hormone

transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J. Fish Biol.* **63**, 398-409

**McKenzie, D. J., Piraccini, G., Papini, N., Galli, C., Bronzi, P., Bolis, C. G. and Taylor, E. W.** (1997). Oxygen consumption and ventilatory reflex responses are influenced by dietary lipids in sturgeon. *Fish Physiol. Biochem.* **16**, 365-379.

**McKenzie, D. J., Piraccini, G., Piccolella, M., Steffensen, J. F., Bolis, C. L., Taylor, E. W.** (2000). Effects of dietary fatty acid composition on metabolic rate and responses to hypoxia in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol. Biochem.* **22**, 281-296.

**McKenzie, D. J., Piraccini, G., Steffensen, J. F., Bolis, C. L., Bronzi, P. and Taylor, E. W.** (1995). Effects of diet on spontaneous locomotor activity and oxygen consumption in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Fish Physiol. Biochem.* **14**, 341-355.

**McKenzie, D. J., Shingles, A. and Taylor, E. W.** (2003a). Sub-lethal plasma ammonia accumulation and the swimming performance of salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* **135.A**, 515-526

**Nelson, J. A., Gotwalt, P. A., Reidy, S. P. and Webber, D. M.** (2002). Beyond  $U_{crit}$ : matching swimming performance tests to the physiological ecology of the animal, including a new 'drag strip'. *Comp. Biochem. Physiol.* **133**, 289-302.

**Parrish, C. C. and Ackman, R. G.** (1985). Calibration of the Iatroscan-Chromarod system for marine lipid class analyses. *Lipids* **20**, 521-530.

**Pepe, S. and McLennan, P. L.** (2002). Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation* **105.19**, 2303-2308.

- Pickett, G. D. and Pawson, M. G.** (1994) Sea bass. Biology, exploitation and conservation. In: *Fish and Fisheries series, 12* (ed. Chapman and Hall), pp. 337. London.
- Plaut, I.** (2001). Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp. Biochem. Physiol.* **131**, 41-50.
- Randall, D. J., McKenzie, D. J., Abrami, G., Bondiolotti, G. P., Natiello, F., Bronzi, P., Bolis, L. and Agradi, E.** (1992). Effects of diet on response to hypoxia in sturgeon (*Acipenser naccarii*). *J. Exp. Biol.* **170**, 113-125.
- Richards, R. G., Mercado, A. J., Clayton, C. A., Heigenhauser, G. J. F. and Wood, C. M.** (2002). Substrate utilisation during graded aerobic exercise in rainbow trout. *J. exp. Biol.* **205**, 2067-2077.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and Estevez, A.** (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* **177**, 191-199.
- Sidell, B. D. and Driedzic, W. R.** (1985). Relationship between cardiac energy metabolism and cardiac work demand in fishes. In: *Circulation, Respiration and Metabolism* (ed. G. Gilles), pp. 381-401. Berlin: Springer-Verlag.
- Thorarensen, H., Gallagher, P. E. and Farrell, A. P.** (1996) Cardiac output in swimming rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, acclimated to seawater. *Physiol. Zool.* **69**, 139-153
- Tocher, D. R.** (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* **11**, 107-184.
- Videler, J. J.** (1993). Fish Swimming. Chapman and Hall, London.
- Wagner, G. N., Balfry, S. K., Higgs, D. A., Lall, S. P. and Farrell, A. P.** (2004). Dietary fatty acid composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* **137.A**, 567-576.

**Webb, P. W.** 1993. Swimming. In: *The Physiology of Fishes* (ed D.D. Evans), pp. 47-73.

Boca Raton, Ca: CRC Press.

**Webb, P. W.** (1998). Swimming. In: *The physiology of fishes* (ed D. H. Evans), pp. 3-24.

New York: CRC Marine science series.

**Xiao, Y., Gomez, A. M., Morgan, J. P., Lederer, W. J. and Leaf, A.** (1997).

Suppression of voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4182-4187.

## Figure legends

**Figure 1.** . Effects of diet on mean ( $\pm$  SEM) critical swimming speed ( $U_{crit}$ ). Green column is mean of CO fed fish group (n=6), red column is mean of PO fed fish group (n=6) and blue column is mean of FO fed fish group (n=6). Dissimilar letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between dietary treatments.

**Figure 2.** Effects of diet on immobile metabolic rate (IMR) (A), active metabolic rate (AMR) (B) and aerobic scope (AS) (C) in sea bass during swim test. Values are Mean  $\pm$  SEM of fishes fed as either Canola oil diet (green column), Palm oil diet (red column) or Fish oil diet (blue column). N=6 for each diet. Dissimilar letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between dietary treatments.

**Figure 3.** Effects of diet on routine cardiac output (A), maximum cardiac output (Q max) (B) and cardiac scope (Q scope) (C) in sea bass during swim test. Values are Mean  $\pm$  SEM of fishes fed as either Canola oil diet (green column), Palm oil diet (red column) or Fish oil diet (blue column). N=6 for each diet. Dissimilar letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between dietary treatments.

**Figure 4.** Projections of individuals represented in the plane of the 2 first main functions. This plane represents a variance of 52%. Axis 1 and 2 represent respectively a variance of 34% and 18%. C represent individuals of the CO group (green points, n=6), P represent individuals of the PO group (red points, n=6) and F represent individuals of the FO group (blue points, n=6).

**Table 1.** Fatty acid composition of lipids in the diets in percentage of total fatty acids. FO, fish oil diet; CO, canola oil diet; PO, palm oil diet; SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

	<b>Dietary fatty acids</b>		
	FO	CO	PO
14:0	3,29	0,70	0,91
16:0	13,33	8,49	20,39
16:1n-7	4,09	0,93	0,78
18:0	2,37	1,71	2,51
18:1n-7	2,63	2,94	1,61
18:1n-9	27,31	43,94	43,52
18:2n-6	10,18	19,24	14,91
18:3n-3	4,54	8,53	3,96
18:4n-3	1,62	0,45	0,39
20:1n-9	5,27	3,50	2,63
20:4n-3	0,61	0,08	0,07
20:4n-6	0,38	0,11	0,09
20:5n-3	6,98	2,30	1,09
22:1n-11	3,68	0,86	1,11
22:5n-3	1,15	0,16	0,12
22:6n-3	6,29	2,21	1,88
SFA	20,65	12,71	26,05
MUFA	45,49	53,79	50,97
PUFA	33,86	33,51	22,97

**Table 2.** Growth (Daily growth), condition factor (Fulton's index),  $V_{SH}$  and  $f_H$  performances of sea bass fed with FO diet (Fish oil column, n=6), CO diet (Canola oil column, n=6) or PO diet (Palm oil column, n=6). Values are means  $\pm$  SEM. Dissimilar letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between dietary treatments.

	FO	CO	PO
Daily growth	$0.51 \pm 0.10^a$	$0.31 \pm 0.03^a$	$0.36 \pm 0.03^a$
Fulton's index	$1.46 \pm 0.04^a$	$1.36 \pm 0.02^a$	$1.33 \pm 0.06^a$
routine $V_{SH}$	$0.73 \pm 0.18^a$	$0.96 \pm 0.20^a$	$0.78 \pm 0.07^a$
max $V_{SH}$	$0.98 \pm 0.18^a$	$1.28 \pm 0.20^a$	$1.06 \pm 0.08^a$
increase in $V_{SH}$	$0.25 \pm 0.05^a$	$0.32 \pm 0.05^a$	$0.28 \pm 0.04^a$
routine $f_H$	$48.58 \pm 5.2^a$	$44 \pm 7.02^a$	$45.21 \pm 2.39^a$
max $f_H$	$90.15 \pm 2.28^a$	$95.14 \pm 3.76^a$	$96.67 \pm 1.35^a$
increase in $f_H$	$41.57 \pm 5.55^a$	$51.14 \pm 5.94^a$	$51.46 \pm 3.45^a$

**Table 3.** Fatty acids composition of polar lipids in white muscle and heart of sea bass from the 3 dietary groups. Values = mean  $\pm$  SEM; FOD, fish oil diet (n=7); COD, canola oil diet (n=8); POD, palm oil diet (n=8); SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids. Dissimilar letters indicate significant differences (P<0.05) between dietary treatments.

	Muscle polar fatty acids			Heart polar fatty acids		
	FO	CO	PO	FO	CO	PO
16:0	19,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	16,7 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	24,3 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	17,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	16,5 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	19,0 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>
18:0	6,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	6,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	5,4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	5,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>
18:1n-7	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
18:1n-9	14,0 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	20,3 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	16,9 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	13,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	17,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	15,5 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
18:2n-6	4,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	10,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	11,5 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	4,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	9,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	9,1 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
18:3n-3	1,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
20:1n-9	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>ab</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
20:4n-6	2,2 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	3,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
20:5n-3	10,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	6,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	6,3 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	9,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	8,0 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>
22:5n-3	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
22:6n-3	32,5 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	26,7 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	23,3 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	28,3 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	28,7 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	28,5 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>
SFA	26,5 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	23,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	30,7 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	26,6 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	23,0 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	25,1 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>
MUFA	18,9 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	24,4 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	21,9 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	20,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	22,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	20,6 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
PUFA	54,6 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	51,8 $\pm$ 1,1 <sup>ab</sup>	47,4 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	52,7 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	54,2 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	54,3 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>

**Table 4.** Pearson correlations between heart polar lipids and physiological traits. P represents a significant positive correlation and N represent a significant negative correlation (P<0.05).

	16:0	18:1n-9	18:2n-6	20:5n-3	22:5w3	22:6n-3
Daily growth			N	P	P	
Fulton's index				P	P	
IMR	P				N	N
AMR		P	P	N	N	
aerobic scope		P	P	N	N	
routine Q						
max Q			P			
Q scope		P	P			
max $f_H$			P			
Ucrit		P	P	N	N	

Figure 1.

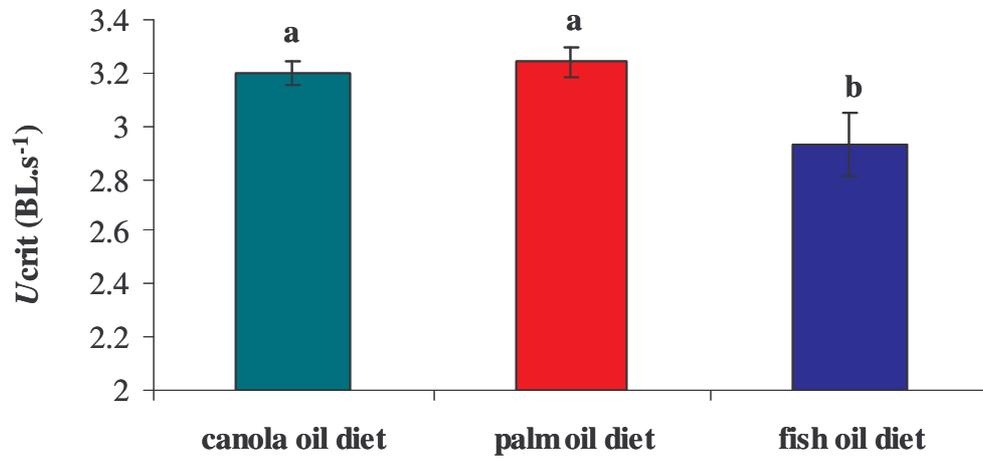


Figure 2.

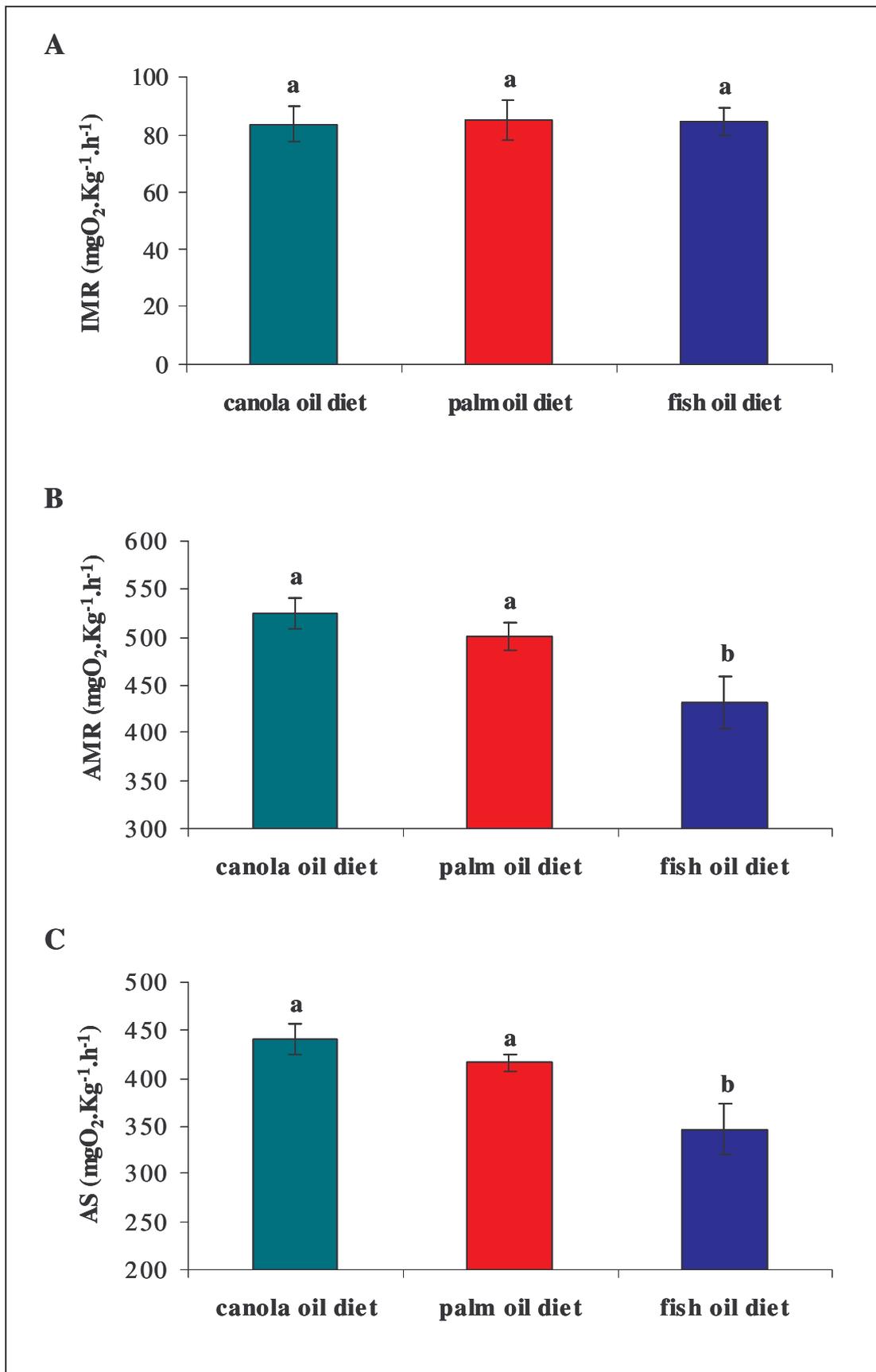


Figure 3

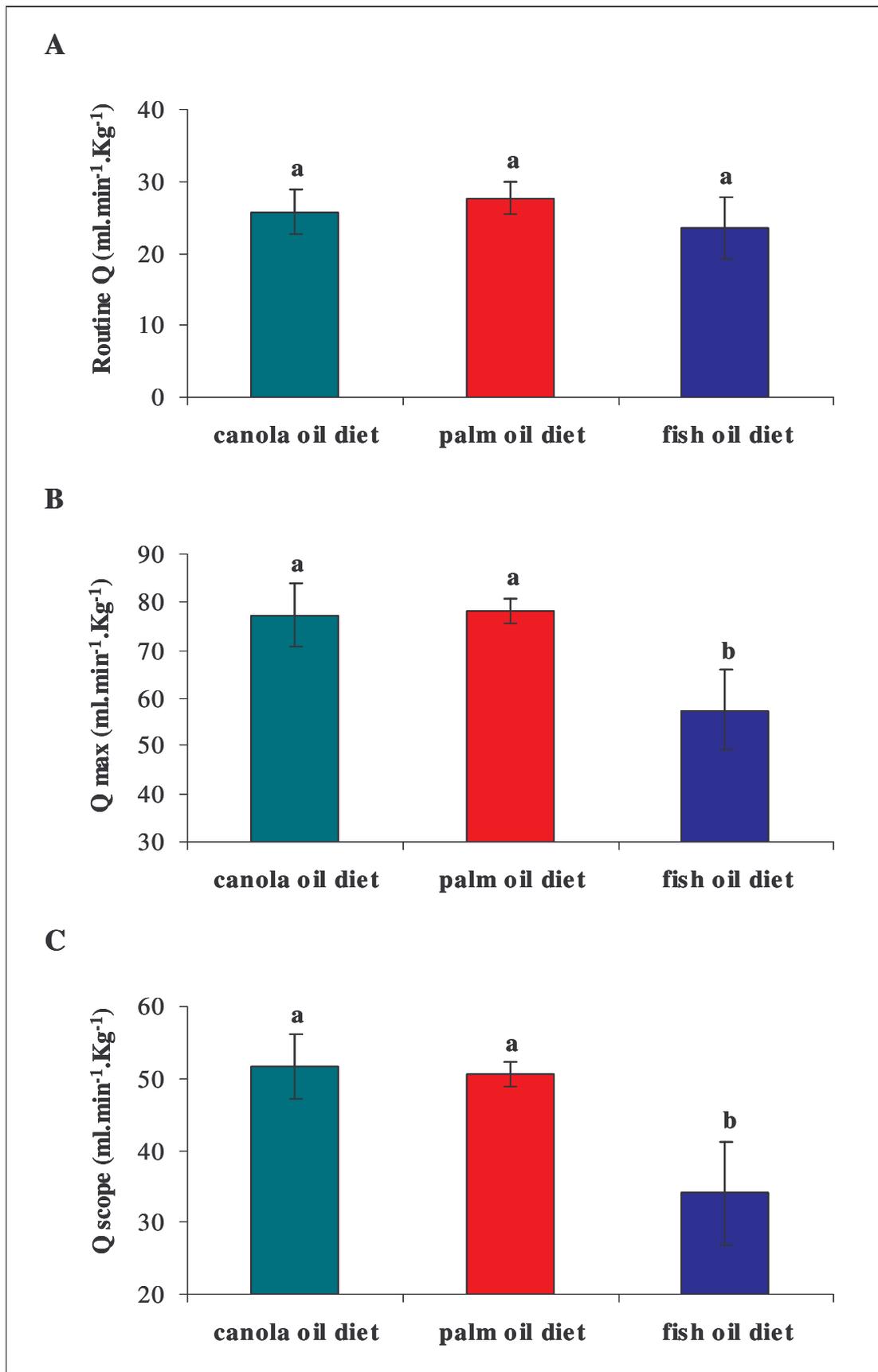
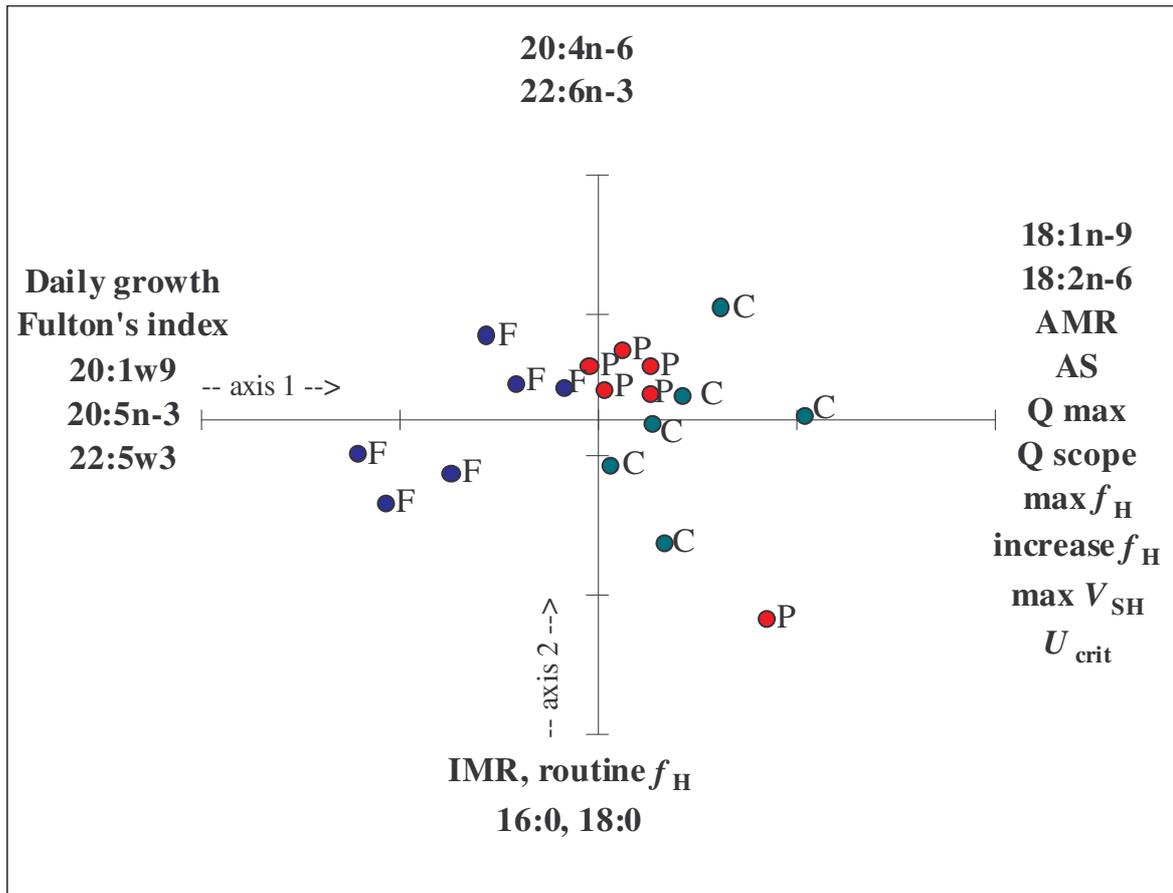


Figure 4.



# *Chapitre I-2*

---

Effets des acides gras alimentaires  
sur la tolérance à l'hypoxie des bars européens  
(*Dicentrarchus labrax*)

---

## Effets des acides gras alimentaires sur la tolérance à l'hypoxie des bars européens (*Dicentrarchus labrax*)

---

### Introduction

Les organismes à respiration aquatique vivent dans un milieu pauvre en oxygène : la concentration en oxygène de l'eau est en effet environ 30 fois plus faible que celle de l'air. A métabolisme égal, l'animal aquatique doit donc ventiler relativement plus que l'animal aérien (Dejours et al., 1970). De plus le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau est très inférieur à celui du milieu aérien. En l'absence de mouvement de convection dans le milieu les poissons, contrairement aux organismes terrestres, sont plus susceptibles de rencontrer des situations hypoxiques dans leur environnement. Les Ag de type n-3 PUFA sont connus pour leurs effets protecteurs cardiaques lors des conditions hypoxiques (Agnisola et al., 1996; Pepe et McLennan, 2002). Deux mécanismes d'action semblent émerger pour expliquer ces effets:

- le premier est lié à un effet des n-3 PUFA sur le métabolisme énergétique. En effet, des expériences réalisées chez l'esturgeon et l'anguille ont montré que la consommation d'oxygène de repos (métabolisme basal) de ces poissons était diminuée lorsqu'ils étaient nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA comparativement à une alimentation riche en SFA. Ce taux métabolique mesure les coûts énergétiques de maintenance comprenant notamment le renouvellement cellulaire, l'homéostasie cellulaire et d'une manière plus générale, le maintien des fonctions vitales d'un organisme au repos. Des expériences mettant en œuvre une baisse de la quantité d'oxygène disponible dans l'eau, ont également été réalisées. Ces travaux n'ont révélé aucun effet de l'hypoxie sur la consommation d'oxygène des esturgeons nourris avec l'alimentation riche en n-3 PUFA. A l'inverse, des poissons nourris avec une alimentation riche en Ag saturés, étaient incapables de maintenir leur consommation d'oxygène de routine au même niveau que celui observé en conditions normoxiques (pour revue: McKenzie, 2001). Il apparaît

également que les performances cardiaques d'animaux nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA sont moins affectées par une hypoxie que celles d'animaux nourris avec une alimentation riche en SFA (Agnisola et al., 1996; Pepe et McLennan, 2002). Ces différences suggèrent une utilisation de l'oxygène plus efficace, c'est-à-dire un travail cardiaque plus élevé pour une disponibilité en oxygène similaire, chez les animaux nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA par rapport à ceux nourris avec une alimentation riche en SFA.

- le deuxième mécanisme, observé chez les mammifères, est attribué à l'effet des n-3 PUFA non estérifiés sur des conductances ioniques impliquées dans la genèse d'arythmies. Chez le mammifère les n-3 PUFA non estérifiés, et principalement l'EPA et le DHA, inhibent l'entrée de calcium dans les cellules cardiaques *via* les canaux calciques de type L (Hallaq et al., 1992; Xiao et al., 1997). L'EPA et le DHA peuvent également réduire les libérations de calcium du RS (Negretti et al., 2000; Swan et al., 2003; Honen et al., 2003). Il en résulte une diminution significative de la quantité de calcium intracellulaire. Ceci pourrait limiter l'apparition d'arythmies cardiaques induites par une surcharge calcique observée en conditions hypoxiques. Par ailleurs, les n-3 PUFA inhibent les courants sodiques rapides et déplacent ainsi le seuil de déclenchement du PA cardiaque vers des potentiels plus positifs (Xiao et al., 1995; 1998; 2000; 2004; Leifert et al., 1999). Ceci limite alors les risques d'apparition de PA supplémentaires et l'entrée du cœur en arythmie.

Le chapitre précédent (Chapitre I-1) a montré que la composition en Ag de l'alimentation influait sur la composition tissulaire en Ag. Il a également permis de mettre en évidence que ces différences de composition tissulaires étaient associées à des différences de performances cardiaques et respiratoires. En effet, de fortes teneurs tissulaires en OA et LA étaient corrélées positivement avec la capacité des bars à augmenter leur débit cardiaque et leur consommation d'oxygène. Ceci s'est également traduit par des performances de nage plus élevées. Toutefois, contre toute attente, les poissons nourris avec l'alimentation enrichie en Ag de type n-3 PUFA possédaient des performances cardiaques et respiratoires plus faibles que ceux nourris avec les deux autres types d'alimentations. Chez les poissons, la fonction cardiaque jouerait un rôle déterminant dans la limitation des performances de nage. En effet, lors d'un exercice musculaire soutenu, un apport insuffisant en oxygène serait responsable de la limitation des

performances cardiaques (Farrell 2002). Ceci aboutirait à un débit cardiaque insuffisant pour permettre le maintien de l'exercice.

Dans ces conditions, la protection du cœur contre l'hypoxie par les n-3 PUFA serait susceptible d'améliorer les performances de nage des poissons. Hors, dans notre étude précédente, aucun effet bénéfique des n-3 PUFA n'a été observé sur les performances natatoires des poissons. Ainsi, nous pouvons donc nous demander si, comme il a été précédemment montré (Agnisola et al., 1996), ces Ag ont un effet protecteur cardiaque lors d'une hypoxie? De plus, l'alimentation riche en OA et LA a des effets bénéfiques sur les performances cardiaques et la consommation d'oxygène des bars au cours d'un effort musculaire intense. Ces effets sont-ils dus à une modulation la tolérance à l'hypoxie cardiaque de ces poissons? Le but de la présente étude était donc de tester l'influence de ces mêmes alimentations sur la tolérance à l'hypoxie des bars, et sur leur capacité de récupération suite à cette épreuve.

Pour cela, les poissons ont été soumis à différents niveaux d'hypoxie d'une durée de 20 minutes. Le débit, le rythme cardiaque, la valeur déduite du VES ainsi que la consommation d'oxygène des poissons ont été mesurés pour chaque palier hypoxique. Les poissons ont ensuite été soumis (après 30 minutes de récupération) à une épreuve de nage similaire à celle utilisée lors de l'étude précédente.

---

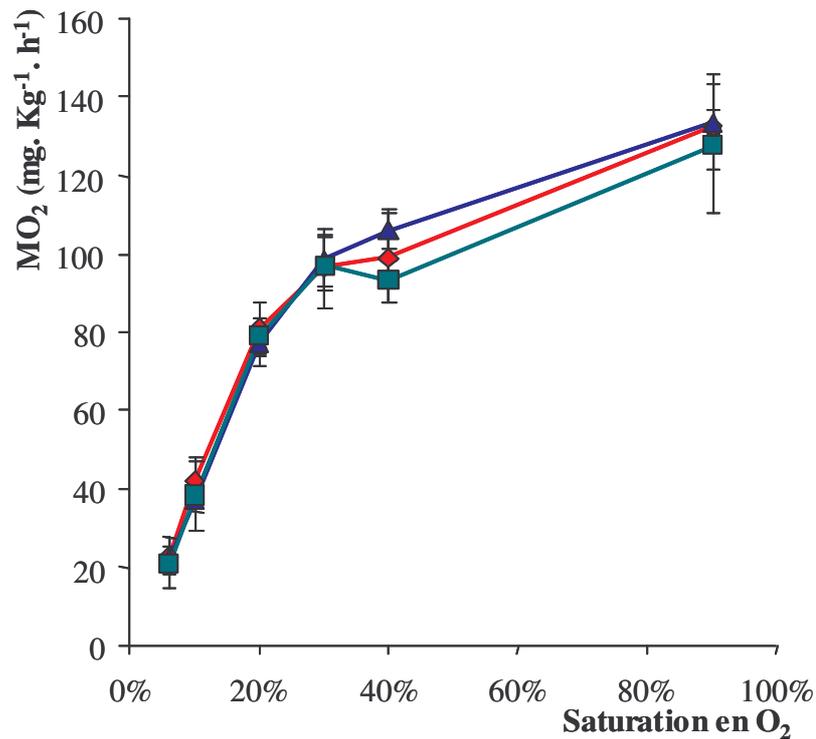
## Résultats

### Epreuve d'hypoxie

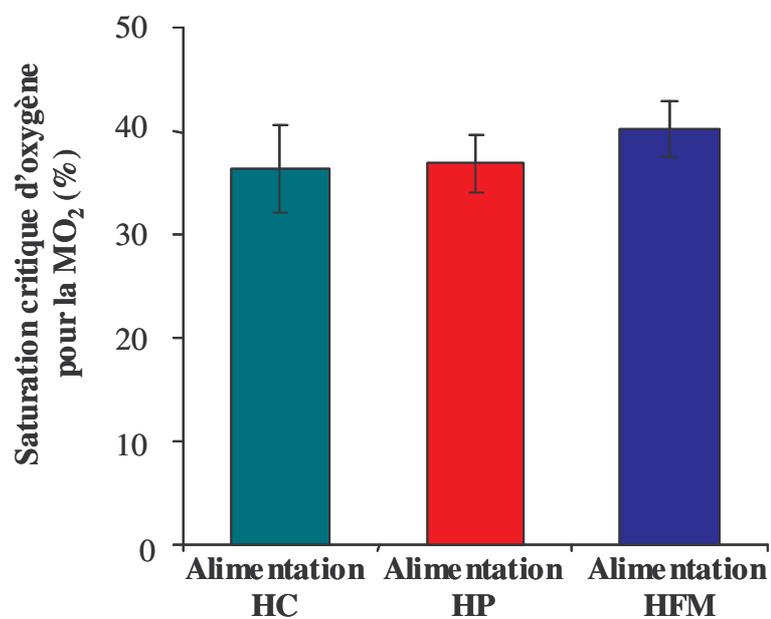
Cette partie porte sur l'évolution de la consommation d'oxygène et du débit cardiaque des bars au cours d'une baisse progressive de la teneur en oxygène de l'eau. L'expérience est arrêtée dès qu'une perte d'équilibre du poisson est observée. Le temps et la saturation en oxygène de l'eau sont alors mesurés. Tous les poissons testés ont atteint le palier correspondant à une saturation en oxygène de 6%. Lors de ce palier, certains poissons ont été incapables de maintenir leur équilibre. Le temps moyen tenu à ce palier fut respectivement de  $13,8 \pm 2,92$ ;  $16 \pm 3,89$  et  $15,33 \pm 2,16$  minutes pour les poissons nourris avec l'alimentation HFM; HC et HP. Ces valeurs ne sont pas statistiquement différentes.

- Effet de l'hypoxie sur la consommation d'oxygène en fonction de l'alimentation (Figure R 1)

En normoxie (saturation de 90%), il n'y a aucune différence significative de métabolisme de routine entre les différentes alimentations. Les valeurs de consommation d'oxygène sont respectivement de  $133,53 \pm 3,05$ ;  $127,95 \pm 17,61$  et  $132,43 \pm 10,87$  mg. Kg<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> pour l'alimentation HFM (n = 5); HC (n = 4) et HP (n = 6). Plus la saturation en oxygène descend, plus la MO<sub>2</sub> des poissons diminue jusqu'à atteindre une valeur de  $22,30 \pm 3,01$ ;  $20,99 \pm 6,52$  et  $22,71 \pm 4,62$  mg. Kg<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> respectivement pour HFM, HC et HP soit une diminution d'environ 83 % de la MO<sub>2</sub>. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes. Cette diminution de MO<sub>2</sub>, qui est consécutive à la décroissance de saturation en oxygène de l'eau, suit la même évolution quelle que soit l'alimentation des poissons. Ceci est confirmé par le calcul de la saturation critique en oxygène (%Crit) dont les moyennes sont respectivement de  $40,21 \pm 6,9$ ;  $36,77 \pm 7,6$  et  $31,72 \pm 4,77$  % pour HFM, HC et HP.

**Figure R 1**

Evolution de la consommation d'oxygène des poissons en fonction de la saturation en oxygène de l'eau. Les carrés verts représentent les poissons nourris avec l'alimentation HC (n = 4), les triangles bleus: les poissons nourris avec l'alimentation HFM (n = 5) et les losanges rouges: les poissons nourris avec l'alimentation HP (n = 6). Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM.



Valeur de saturation critique d'oxygène ( $\pm$  SEM) pour la MO<sub>2</sub> en fonction de l'alimentation des poissons. (Alimentation HC, n = 4; HP n = 6 et HFM n = 5). Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM.

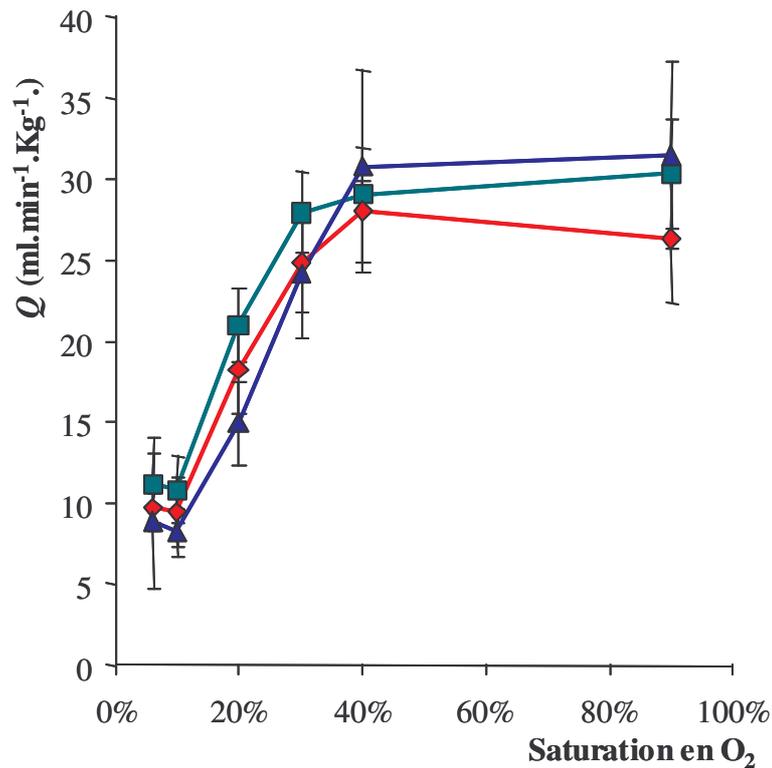
- Effets sur le débit, la fréquence cardiaque et le VES en fonction de l'alimentation (Figure R 2)

En conditions normoxiques, il n'y a aucune différence significative entre les différentes alimentations. Les valeurs de débit cardiaque ne varient pas, elles sont respectivement de  $31,48 \pm 5,74$ ;  $30,34 \pm 3,43$  et  $26,36 \pm 4,07$  ml.min<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup> pour les poissons alimentés avec la nourriture enrichie en HFM (n = 5), HC (n = 4) et HP (n = 6). Plus la saturation en oxygène diminue, plus le débit cardiaque décroît jusqu'à atteindre les valeurs respectives de  $8,93 \pm 4,22$ ;  $11,20 \pm 2,87$  et  $9,69 \pm 0,94$  ml.min<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup> pour les alimentations HFM, HC et HP. Ces valeurs de débit cardiaque, à 6% de saturation en oxygène, ne sont pas significativement différentes entre elles. Au cours de l'épreuve d'hypoxie la diminution du débit cardiaque résulte principalement d'une diminution de fréquence cardiaque. Dans ce cas, le VES n'est que très peu modifié (Figure R 3). Pour les trois alimentations concernées, la diminution de fréquence est d'environ 66 % entre une saturation de 90 % et une saturation de 6 % d'oxygène. D'autre part, aucune différence significative n'apparaît entre les valeurs de saturation critique d'oxygène concernant le débit. Les valeurs obtenues sont respectivement de  $42,38 \pm 6,9$ ;  $36,77 \pm 7,6$ ; et  $31,72 \pm 4,77$  % pour les alimentations HFM, HC et HP.

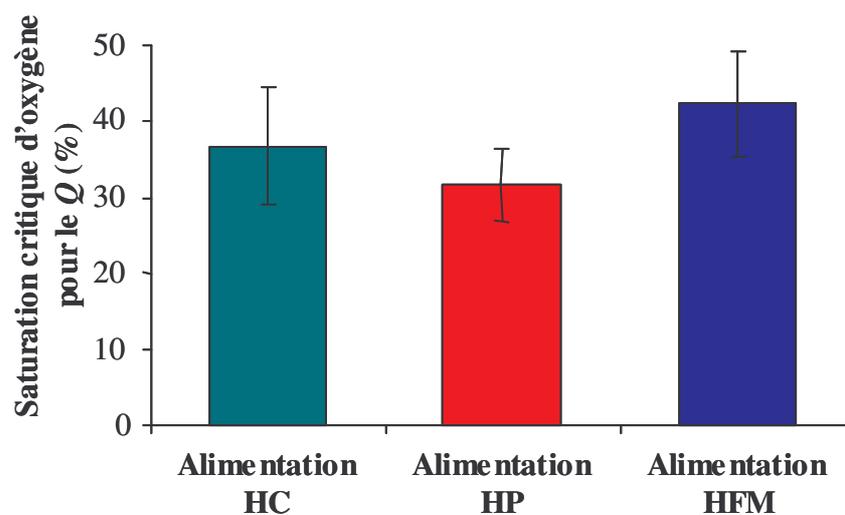
### **Epreuve de nage suite à l'hypoxie**

Trente minutes après le challenge hypoxique et le retour en condition d'oxygénation normoxique, l'étude des performances cardiaques et respiratoires est effectuée dans le cadre d'un test d'effort standardisé. Dans ces conditions, aucune différence significative n'est alors observée pour  $U_{crit}$  en fonction de l'alimentation. Les valeurs de  $U_{crit}$  sont respectivement de  $3,15 \pm 0,11$ ;  $3,22 \pm 0,12$  et  $3,39 \pm 0,11$  BL.s<sup>-1</sup> respectivement pour les poissons HFM, HC et HP.

En outre, les différentes alimentations n'affectent en rien l'IMR et l'AMR (Tableau R 3). En conséquence, l'AS n'est pas significativement différent et est de  $288,73 \pm 28,07$ ;  $285,31 \pm 66,42$  et  $390,21 \pm 29,94$  mg. Kg<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> pour les poissons HFM, HC et HP (Figure R 4).

**Figure R 2**

Evolution du débit cardiaque ( $Q$ ) des poissons en fonction de la saturation en oxygène de l'eau. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM. Les carrés verts représentent les poissons nourris avec l'alimentation HC ( $n = 4$ ), les triangles bleus: les poissons nourris avec l'alimentation HFM ( $n = 5$ ) et les losanges rouges: les poissons nourris avec l'alimentation HP ( $n = 6$ ).

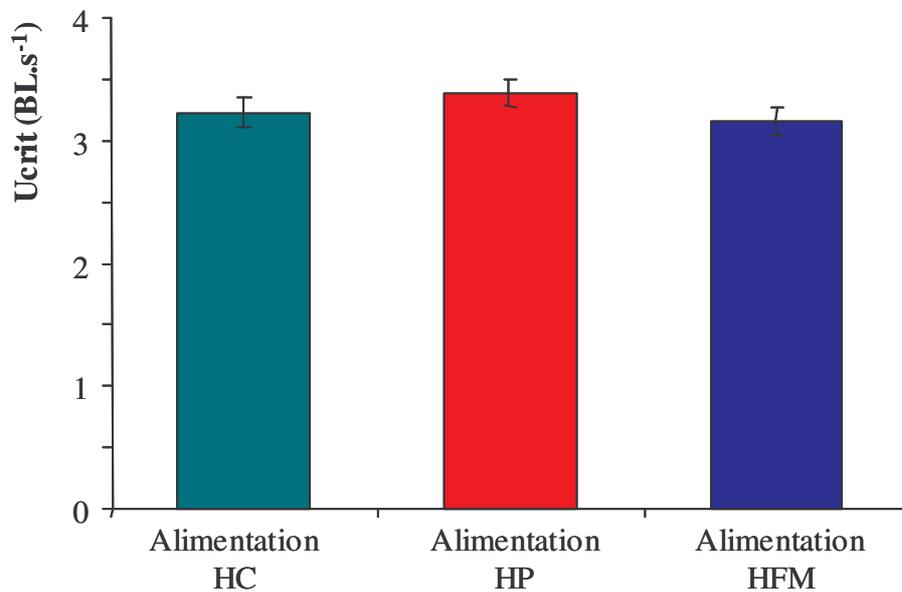


Valeurs moyennes de saturation critique d'oxygène ( $\pm$  SEM) pour le débit cardiaque ( $Q$ ) en fonction de l'alimentation des poissons. (Alimentation HC,  $n = 4$ ; HP  $n = 6$  et HFM  $n = 5$ ).

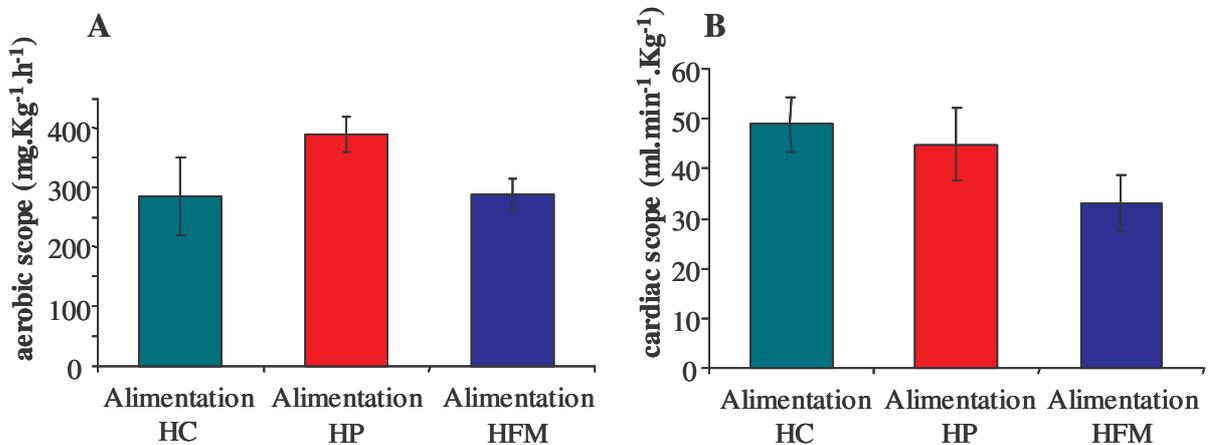
**Tableau R 3**

	Alimentation HFM	Alimentation HC	Alimentation HP
Fq à 90 % de saturation (bpm)	41,93 ± 4,30 <sup>a</sup>	33,80 ± 1,05 <sup>a</sup>	41,94 ± 4,77 <sup>a</sup>
Fq à 6% de saturation (bpm)	13,92 ± 5,32 <sup>a</sup>	11,60 ± 3,61 <sup>a</sup>	14,34 ± 3,02 <sup>a</sup>
% de variation de Fq	-68,08 ± 9,26 <sup>a</sup>	-66,26 ± 9,57 <sup>a</sup>	-63,80 ± 8,28 <sup>a</sup>
VES à 90% de saturation (ml.g <sup>-1</sup> )	0,95 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,14 <sup>a</sup>
VES à 6% de saturation (ml.g <sup>-1</sup> )	0,72 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,13 <sup>a</sup>
% de variation de VES	-26,68 ± 8,17 <sup>a</sup>	14,56 ± 15,91 <sup>a</sup>	22,82 ± 19,75 <sup>a</sup>

Evolution de la fréquence cardiaque (Fq) et du volume d'éjection systolique (VES) entre une saturation en oxygène de 90 % et de 6 %. Les valeurs de pourcentage négatives indiquent une diminution de Fq ou de VES; tandis que les valeurs positives indiquent une augmentation. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM. Des lettres distinctes précisent les différences significatives entre chaque alimentation (P < 0,05).

**Figure R 4**

Vitesse critique de nage des bars ( $U_{crit}$ ) suite à l'épreuve d'hypoxie en fonction de leur alimentation enrichie en huile de colza (HC, n = 4), en huile de palme (HP, n = 6) ou en huile de foie de morue (HFM, n = 5). Les valeurs sont les moyennes + SEM.



Influence de l'alimentation sur l'aérobic scope (A) et le cardiaque scope (B) des bars durant l'épreuve de nage suite à l'épreuve d'hypoxie. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM des poissons nourris avec l'alimentation enrichie en huile de colza (HC, n = 4), en huile de palme (HP, n = 6) ou en huile de foie de morue (HFM, n = 5).

Comme le montre le tableau R 3, la différence de composition des régimes alimentaires ne modifie en rien le débit cardiaque initial et le débit cardiaque maximal. En conséquence, le Q scope n'est pas non plus distinct entre les alimentations. Il est respectivement de  $33,01 \pm 5,57$ ;  $48,86 \pm 5,42$  et  $44,90 \pm 7,42$  ml.min<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup> pour les poissons soumis aux régimes alimentaires HFM, HC et HP (figure R 4). Il n'y a pas de différence significative entre les alimentations pour les valeurs initiales et maximales de VES (Tableau R 5). En revanche, les poissons nourris avec une alimentation enrichie en HC présentent un rythme cardiaque initial significativement plus faible que celui des poissons nourris avec les alimentations HFM et HP. L'augmentation du VES et de la fréquence cardiaque au cours de l'épreuve de nage n'est pas significativement différente entre les alimentations utilisées.

**Tableau R 5**

	HFM	HC	HP
IMR	170,73 ± 24,34 <sup>a</sup>	135,90 ± 24,34 <sup>a</sup>	140,3 ± 24,01 <sup>a</sup>
AMR	459,46 ± 8,51 <sup>a</sup>	421,21 ± 66,41 <sup>a</sup>	530,50 ± 29,94 <sup>a</sup>
<i>Q</i> min	34,78 ± 6,59 <sup>a</sup>	27,05 ± 2,19 <sup>a</sup>	25,91 ± 2,31 <sup>a</sup>
<i>Q</i> max	67,79 ± 10,76 <sup>a</sup>	73,41 ± 5,55 <sup>a</sup>	70,81 ± 6,90 <sup>a</sup>
Fq min	68,47 ± 6,33 <sup>a</sup>	44,82 ± 8,53 <sup>b</sup>	60,68 ± 4,16 <sup>ab</sup>
Fq max	87,39 ± 6,34 <sup>a</sup>	86,36 ± 5,53 <sup>a</sup>	90,34 ± 2,05 <sup>a</sup>
Augmentation de Fq	18,93 ± 9,47 <sup>a</sup>	41,54 ± 11,03 <sup>a</sup>	29,66 ± 2,96 <sup>a</sup>
VES min	0,71 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,15 <sup>a</sup>
VES max	1,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,15 <sup>a</sup>
Augmentation de VES	0,51 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,05 <sup>a</sup>

Valeurs de consommation d'oxygène (IMR, AMR), débit cardiaque (*Q*min, *Q*max), fréquence cardiaque (*f*q) et volume d'éjection systolique (VES) des bars nourris avec l'alimentation HFM (n = 5), HC (n = 4) ou HP (n = 6). Les valeurs minimales correspondent aux valeurs mesurées au début de l'épreuve de nage 30 minutes après l'hypoxie. Les valeurs indiquées représentent les moyennes ± SEM. Des lettres distinctes indiquent les différences significatives entre les valeurs.

## Discussion

Les effets des acides gras contenus dans l'alimentation sur la tolérance à l'hypoxie des bars diffèrent de ceux qui étaient observés chez l'esturgeon. En effet, dans une étude de McKenzie et al. (1995), il apparaît qu'un niveau d'hypoxie affectant la  $MO_2$  d'esturgeons nourris avec une alimentation riche en Ag saturés (huile de coco) n'a aucun effet sur la consommation d'oxygène d'esturgeons nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA (huile de poisson). De plus, une autre étude réalisée par McKenzie et al., (1997) sur le même animal utilisant les mêmes alimentations a montré que l'exposition à différents niveaux d'hypoxie n'affectait en aucun cas la fréquence de ventilation des poissons soumis au régime de type n-3 PUFA. Par contre, ceux alimentés en Ag saturés étaient beaucoup plus sensibles à l'hypoxie. En effet, très rapidement, ces poissons entraient en « hyperventilation ». Dans notre épreuve d'hypoxie, aucune variation de la  $MO_2$  ni de la saturation critique en oxygène n'a été observée, quelle que soit l'alimentation. Le fait que l'huile de coco utilisée dans les expériences de McKenzie et al. (1995, 1997) soit préalablement hydrogénée pourrait expliquer cette différence de résultat. En effet, l'hydrogénation de l'huile de coco a pour conséquence d'augmenter le taux d'acides gras saturés. L'huile de coco serait alors plus « saturée » que l'huile de palme utilisée au cours de notre étude, aboutissant ainsi à une différence plus importante de la composition en Ag entre l'alimentation riche en n-3 PUFA et celle riche en Ag saturés.

Chez les mammifères, de nombreuses études ont montré qu'une alimentation riche en n-3 PUFA augmentait la tolérance à l'ischémie cardiaque et la récupération cardiaque après ischémie (Charnock et al., 1992; Pepe et McLennan, 2002). Lors nos expérimentations, les différents degrés d'hypoxie n'ont pas affecté les performances cardiaques des poissons quelles que soient leurs alimentations. En effet, aucune différence du débit et de la fréquence cardiaques ou du volume d'éjection systolique n'a été constatée. Ces résultats sont donc en contradiction avec les résultats obtenus chez les mammifères mais également chez les poissons comme l'esturgeon (Agnisola et al., 1996). En effet, l'étude d'Agnisola et al. (1996) a montré que lorsque les cœurs isolés, d'esturgeons nourris avec une alimentation riche en Ag saturés (huile de coco hydrogénée), étaient faiblement approvisionnés en oxygène, il en résultait une diminution significative de la puissance cardiaque maximale. A l'inverse, cette hypoxie était sans effet sur des cœurs de poissons

nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA (huile de poisson). L'utilisation par ces auteurs, d'huile de coco préalablement hydrogénée, pourrait de la même façon que précédemment, expliquer cette différence de résultat expérimental. Ainsi, les effets bénéfiques des n-3 PUFA tissulaires, observés par rapport à des animaux nourris avec une alimentation « très saturée » (par l'apport d'huile de coco hydrogénée) seraient beaucoup plus visibles. De plus, ces études sont réalisées sur le cœur isolé tandis que notre étude porte sur la mesure des performances cardiaques *in vivo* pendant l'épreuve d'hypoxie.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, des facteurs autres que la composition tissulaire en Ag sont susceptibles d'intervenir dans la régulation de l'activité cardiaque. Par exemple, l'hypoxie est connue pour stimuler la libération de catécholamines chez les poissons (Thomas et Perry, 1992). Ces neuro-hormones pourraient moduler l'activité cardiaque des poissons et masquer les effets des Ag tissulaires sur la tolérance à l'hypoxie. En effet, il a été montré qu'une modification des taux et de la nature des Ag tissulaires modulait la disponibilité et les mécanismes de transduction des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques (Grynberg et al., 1995; Benediktsdottir et al., 1999). Ainsi, la sensibilité aux catécholamines peut varier en fonction de l'alimentation utilisée. Dans la présente étude, contrairement aux observations précédentes décrites dans le chapitre I-1, nous n'avons remarqué aucune modification de  $U_{crit}$ , lors de l'épreuve de nage consécutive à l'hypoxie. Le «cardiac scope» et l'AS ne sont également plus significativement différents entre les alimentations. Cette perte de différence pourrait être la conséquence de l'élévation du taux de catécholamines circulantes, associée à une sensibilité différente des poissons pour ces hormones en fonction de leur régime alimentaire.

Chez les mammifères, les NEFA, et plus particulièrement les n-3 PUFA non estérifiés, possèdent un effet protecteur cardiaque par rapport aux SFA lors des conditions hypoxiques (Pepe et McLennan, 2002). Cet effet protecteur passe notamment par l'inhibition de l'entrée de calcium dans les cellules *via* leur action sur les canaux calciques de type L et le RS (Hallaq et al., 1992; Xiao et al., 1997; Honen et al., 2003). Au cours d'une hypoxie chez le mammifère, l'augmentation des catécholamines circulantes favorise, par leur action lipolytique, l'élévation du taux de NEFA circulant. Ceci permet de potentialiser les effets des n-3 PUFA sur les canaux calciques de type L et explique en partie l'effet protecteur cardiaque de ces Ag pendant l'hypoxie. En revanche, l'augmentation de NEFA plasmatiques est très controversée chez les poissons et varie en fonction du type d'animal. Chez les poissons tolérant à l'hypoxie comme le carassin (*Carassius auratus*), la carpe (*Cyprinus carpio*) ou la brème (*Abramis brama*), les NEFA

plasmatiques diminuent. A l'inverse leurs concentrations augmentent chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la lamproie (*Lampetra fluviatilis*) et la plie (*Pleuronectes platessa*) pendant l'hypoxie (Farkass, 1967; Mazeaud, 1973; Plisetskaya, 1980; White et Fletcher, 1989; Van Raaij et al., 1994a et b). Une étude de Van Raaij et al. (1995) a montré que la perfusion d'adrénaline chez la carpe induisait une augmentation de NEFA plasmatiques tandis que la perfusion de noradrénaline provoquait un effet contraire. La concentration des NEFA plasmatiques serait donc dépendante de la proportion de noradrénaline et d'adrénaline circulantes. L'augmentation chez la truite, du rapport des concentrations adrénaline/noradrénaline plasmatiques, pendant l'hypoxie (Van Raaij et al., 1996) pourrait expliquer l'élévation de concentration de NEFA observée. A notre connaissance, le taux de NEFA ou de catécholamines circulant chez les bars n'a jamais été quantifié. Les nombreuses différences observées entre les espèces étudiées rendent difficiles toutes estimations de la quantité de NEFA circulante. Cependant, une étude réalisée par Van Raaij et al. (1996) a montré chez la carpe (une espèce où les NEFA diminuent pendant l'hypoxie) que la diminution de NEFA plasmatiques débutait après une heure d'hypoxie sévère et devenait significative après deux heures. Dans cette étude, des expériences sur des truites soumises à un niveau d'hypoxie similaire ont montré un taux de NEFA stable pendant les deux premières heures. Dans nos conditions expérimentales, l'épreuve d'hypoxie est d'une durée relativement courte et ne dépasse pas 80 minutes une fois le seuil critique d'oxygène atteint. Nous pouvons alors supposer que le taux de NEFA circulant reste à peu près stable pendant la durée de l'épreuve. Par ailleurs, si en situation de normoxie les Ag représentent les substrats majoritaires du métabolisme, lors d'une hypoxie ou d'une anoxie, les carbohydrates deviennent les substrats préférentiels (Van den Thillart et Van Raaij, 1995). Dans ces conditions, les NEFA ne sont plus utilisés par le métabolisme. Si leur apport reste inchangé, les NEFA seront donc susceptibles de s'accumuler au niveau cellulaire. Ceci va pouvoir engendrer une potentialisation des effets directs des NEFA sur les conductances ioniques cellulaires. Dans ces conditions, de la même manière que chez les mammifères, l'élévation des n-3 PUFA devrait aboutir à une protection cardiaque lors de l'hypoxie. Toutefois, nos résultats n'indiquent aucun effet bénéfique de l'alimentation HFM (riche en n-3 PUFA) par rapport aux alimentations HC et HP. Ils ne permettent donc pas de confirmer cette hypothèse.

Au cours de nos expériences, les bars ont démontré des niveaux de tolérance à l'hypoxie importants en atteignant des niveaux de saturation en oxygène relativement bas (6 %). Nos résultats sont en accord avec ceux de Lefrançois et al. (1998) obtenus chez le

bar à 15°C. En effet, la valeur de la saturation critique en oxygène est comparable à celle obtenue lors de leur étude. La fréquence cardiaque minimale mesurée par ces auteurs, pendant l'épreuve d'hypoxie, est également du même ordre de grandeur que celle que nous avons mesurée. Ceci confirme que la tolérance à l'hypoxie des bars n'a pas été modifiée par les alimentations utilisées. Suite à l'hypoxie, les performances de nage, cardiaques et respiratoires sont comparables à celles obtenues lors de l'étude précédente sur les effets de la nage (Chapitre I-1). Cette récupération rapide indique que les bars, malgré l'absence d'effet protecteur majeur d'une alimentation par rapport aux autres, ont été relativement peu affectés par l'épreuve d'hypoxie.

En conclusion, aucune différence significative n'a pu être observée entre les régimes alimentaires pour ce qui concerne la tolérance à l'hypoxie des bars. Notre étude étant réalisée *in vivo*, de nombreux facteurs ont pu masquer les différents effets des Ag tissulaires et plasmatiques. De plus, les études précédentes sur l'hypoxie se sont généralement focalisées sur les différences entre les n-3 PUFA et les Ag saturés. L'absence d'effet cardiaque au cours de l'hypoxie pourrait être la conséquence d'une différence insuffisante entre le taux d'Ag saturés et de n-3 PUFA dans les alimentations. De plus, d'autres Ag comme les Ag mono-insaturés pourraient également influencer sur la tolérance à l'hypoxie des poissons. En effet, la présence d'un rythme cardiaque significativement inférieur, détecté sur les poissons nourris avec l'huile HC (riche en OA) en début d'épreuve de nage, suggère que l'apport d'acide oléique favoriserait une meilleure récupération des animaux après l'hypoxie. De plus, notre étude précédente a montré un effet bénéfique de l'acide oléique sur la consommation d'oxygène et les performances cardiaques des bars. La forte teneur en acide oléique dans les alimentations HC et HP pourrait ainsi masquer les effets des n-3 PUFA par rapport aux Ag saturés.

## *Chapitre II*

---

Effets aigus et chroniques de l'acide oléique sur  
l'activité des canaux calciques de type L des  
cardiomyocytes ventriculaires du bar européen  
(*Dicentrarchus labrax*)

---

# *Chapitre II-1*

---

Inhibition du canal calcique de type L par l'acide oléique dans les myocytes cardiaques du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)

---

## **Inhibition du canal calcique de type L par l'acide oléique dans les myocytes cardiaques du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)**

---

Ce sous chapitre est présenté sous la forme d'une publication. Cet article est actuellement soumis au « Journal of Experimental Biology ». Il est précédé d'un bref résumé présentant les principaux résultats de l'étude.

La contraction des myocytes cardiaques est induite par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Dans le cœur des vertébrés inférieurs, les canaux calciques de type L constituent une des principales voies d'entrée du calcium dans les cellules contractiles (Vornanen et al., 1997; Fishmeister et Horackova, 1983; Morad et al., 1981; Coyne et al., 2000, Thomas et al., 1996). Bien que le calcium soit essentiel pour la contraction, une surcharge calcique cellulaire peut également provoquer des arythmies et/ou le déclenchement des processus d'apoptose ou de nécrose cellulaire. Cette surcharge calcique est la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie cellulaire provoquée par une hypoxie cardiaque. Il est maintenant admis que les Ag n-3 PUFA non estérifiés peuvent modifier l'influx des ions calcium via  $I_{Ca,L}$  (Xiao et al., 1997, Pepe et al., 1994, Hallaq et al., 1992, Ferrier et al., 2002). Cette propriété est supposée limiter les risques d'arythmies cardiaques induites par une surcharge calcique. Cependant, les n-3 PUFA ne sont pas les seuls Ag capables d'agir sur  $I_{Ca,L}$ . En effet, plusieurs études ont révélé que des Ag non estérifiés comme l'acide arachidonique ou l'OA pouvaient moduler positivement ou négativement l'activité des canaux calciques de type L (Shimada et al., 1992; Liu et al., 2001, Xiao et al., 1997; Huang et al., 1992). Dans le chapitre précédent (Chapitre I-1) nous avons montré que les bars nourris pendant quatre mois avec une alimentation riche en acide oléique (OA), puis soumis à un test de nage standardisé, avaient de meilleures performances cardiaques que les bars nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA. Dans le sang, l'OA représente une part importante des Ag non estérifiés circulants (NEFA). Par exemple, une étude réalisée sur le saumon (*Oncorhynchus nerka*) démontre clairement que la concentration plasmatique d'OA non estérifié, mesurée au cours de leur

migration, peut atteindre 600  $\mu\text{M}$  (Ballantyne et al., 1996). Un taux élevé d'OA pourrait donc influencer sur l'activité cardiaque *via* les canaux calciques de type L.

Le but de ce travail est donc d'analyser les effets de la perfusion d'OA non estérifié sur l'activité des canaux calciques de type L des myocytes ventriculaires du bar. Cette étude a été réalisée en utilisant la configuration «whole-cell» de la technique du patch clamp sur des bars acclimatés à 20°C et nourris avec une alimentation commerciale. Les expériences de patch clamp sont réalisées à 20°C en substituant dans les solutions extracellulaires, le calcium par du baryum afin d'éliminer les courants résiduels éventuels dépendant du calcium.

Les résultats ont montré que l'OA induisait une diminution du courant calcique d'une manière « dose-dépendante » avec une valeur  $\text{IC}_{50}$  de  $12,49 \pm 0,27 \mu\text{M}$ . Une concentration d'OA de 30  $\mu\text{M}$  induit une réduction de la densité de courant d'environ 45% sans modifier le potentiel d'inversion ou la forme de la relation densité de courant/potentiel. De plus, l'OA ne déplace pas les gammes de potentiel des courbes d'activation et d'inactivation. L'OA diminue donc la conductance du courant entrant de type L sans changer sa sélectivité ou sa « voltage-dépendance ». Il permet de limiter l'entrée du calcium dans les myocytes ventriculaires et donc de réduire les risques liés à une trop forte accumulation de cet ion dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent que l'OA pourrait avoir un rôle protecteur cardiaque contre les apparitions d'arythmies induites par une surcharge calcique.

**Effects of oleic acid on the high threshold calcium current  
in seabass (*Dicentrarchus labrax*) ventricular myocytes.**

**A. Chatelier<sup>1\*</sup>, N. Imbert<sup>1</sup>, J. L. Zambonino Infante<sup>2</sup>, D.J. McKenzie<sup>3</sup>, and P. Bois<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup> *Université de La Rochelle, Laboratoire de Biologie et Environnement Marin, Avenue Michel Crépeau, 17042, La Rochelle cedex, France.*

<sup>2</sup> *Unité mixte INRA IFREMER de nutrition des poissons, BP 70, 29280 Plouzané, France.*

<sup>3</sup> *Department of Marine Ecology and Aquaculture, Danish institute for fisheries research, North Sea Centre, DK-9850 Hirtshals, Denmark.*

<sup>4</sup> *Institut de Physiologie et Biologie Cellulaire, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, 86022 Poitiers cedex, France.*

\* Corresponding author: [aurelien.chatelier@univ-lr.fr](mailto:aurelien.chatelier@univ-lr.fr), Tel/Fax, +33 (0)5 46 50 02 94.

## Summary

There is evidence that increasing the content of oleic acid (OA), a monounsaturated fatty acid, in the diets and tissues of seabass (*Dicentrarchus labrax*) can improve their maximum *in-vivo* cardiac performance. The current study employed a patch clamp technique in isolated seabass ventricular myocytes to investigate the hypothesis that OA can exert direct effects upon whole-cell calcium currents. Acute application of physiological doses of free OA evoked a dose-dependent depression of the whole-cell calcium current that was evoked by a voltage step to 0 mV from holding potential of -80 mV. The derived 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was  $12.49 \pm 0.27 \mu\text{M}$ . At a concentration of 30  $\mu\text{M}$ , OA significantly reduced the current density to about 45% of control values, but did not modify either the shape of the current-density voltage relationship or the apparent reversal potential. In addition, OA did not modify the voltage-dependence of either steady state inactivation or activation curves. Taken together, these results indicate that OA decreases the conductance of the L type inward current, without altering its properties of selectivity and its voltage-dependence. The results demonstrate that physiological concentrations of free OA have direct effects upon sarcolemmal calcium currents in seabass cardiac myocytes. The inhibitory effect of OA upon the L-type calcium channel may translate, *in-vivo*, into a protective effect against arrhythmias induced by Ca<sup>2+</sup> overload, particularly at high levels of cardiac work.

Key words: oleic acid, L-type calcium channel, ventricular myocyte, sea bass, fatty acid.

---

**Introduction**

The seabass (*Dicentrarchus labrax*) is a carnivorous and euryhaline teleost that migrates and forages widely in coastal and estuarine waters from the English channel to the north coast of Africa (Picket and Pawson 1994). One result of this life history may be that the animals consume a wide variety of diet items, with a consequent wide diversity in the relative intake of different nutrients. This may be significant in terms of one major nutrient group, the fatty acids (FA), for which tissue content is determined in major part by dietary intake (Sargent et al., 1999). Tissue FA composition has been shown to have significant and profound effects upon the exercise and cardiac physiology of fish (Agnisola et al., 1996; McKenzie et al., 1998; Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted). In particular, increased dietary and tissue levels of oleic acid (OA), a monounsaturated FA, are positively related to improved exercise performance (McKenzie et al. 1998; Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted) and, in the seabass, this is associated with improved *in-vivo* cardiac performance, in particular cardiac scope for work (Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted).

Almost nothing is known about the mechanisms for these phenomena, although they are presumed to reflect the activity of FA at a cellular level, which then influences the function of organs such as the heart and, in turn, the whole animal (McKenzie 2001). Thus, the effects of OA may, at least in part, be due to changes in the contractile function of cardiac myocytes. The contraction of cardiac myocytes is initiated and graded by an increase in the concentration of free intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). In vertebrate hearts, the

contractile  $\text{Ca}^{2+}$  is derived from two sources; external  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the sarcolemma, via either  $\text{Ca}^{2+}$  channels or a Na/Ca exchanger, and internal  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation from stores in the sarcoplasmic reticulum. The relative importance of these two sources differs amongst vertebrate groups. In cardiomyocytes from lower vertebrates, like fish and amphibians,  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) accounts for the major part of the  $\text{Ca}^{2+}$  that activates contraction (Vornanen, 1997; Fischmeister et Horackova, 1983; Morad et al., 1981; Coyne et al., 2000, Thomas et al., 1996). This critical importance of  $I_{\text{Ca,L}}$  for the contraction of fish cardiac myocytes was demonstrated by a profound (>80%) inhibition of force production by verapamil, a blocker of  $I_{\text{Ca,L}}$ , in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) atrial and ventricular myocardium (Aho and Vornanen, 1999). In addition, Driedzic and Gesser (1988) demonstrated that ryanodine, a blocker of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum, did not reduce contractile force in ventricular strips from a number of ectotherms at physiological temperatures and at stimulation frequencies above 0.2 Hz.

Although intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is essential for contractions, cell  $\text{Ca}^{2+}$  overload can lead to cardiac arrhythmias. Indeed, in mammals, an increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration activates a transient inward current composed by the Na/Ca exchanger (Verkerk et al., 2001), a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated chloride current (Verkerk et al., 2000) and a non-selective cation current (Guinamard et al., 2004). If large enough, these can generate sufficient inward current and depolarisation to initiate delayed afterdepolarizations and arrhythmias.

Fatty acids have been shown to have multi-faceted effects upon the cardiac physiology of higher vertebrates (mammals), and this has been the focus of much study (Sergiel et al., 1998; Pepe et McLennan, 2002; Nair et al., 1997). The heart depends heavily upon a supply of FA provided in the bloodstream, for use as aerobic fuels and also as membrane components. In mammals, FA moieties are present in blood either as

unesterified molecules (free FA), or in an esterified form incorporated into mono-, di-, and triacylglycerols, phospholipids and cholesteryl esters (Van Der Vusse et al., 1992). Various unesterified FA (NEFA) have in fact been shown to influence  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in ventricular cells. For example, the n-3 poly-unsaturated fatty acids (n-3 PUFA) eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) can induce a significant inhibition of  $I_{\text{Ca,L}}$  in mammal ventricular myocytes (Xiao et al. 1997; Pepe et al., 1994; Hallaq et al. 1992; Ferrier et al., 2002). The same n-3 PUFA can decrease cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  release (Negretti and al., 2000; Swan et al., 2003; Honen et al., 2003). Those effects of n-3 PUFA are known to protect hearts against arrhythmia induced by  $\text{Ca}^{2+}$  overload. Aside from these established effects of n-3 PUFA, n-6 PUFA such as arachidonic acid (AA), and other long-chain FA, have also been reported to modulate  $I_{\text{Ca,L}}$ , both positively and negatively (Shimada and Somlyo, 1992; Liu et al., 2001; Xiao et al., 1997; Huang et al., 1992).

The potential effects of NEFA on fish cardiac myocytes have never been studied. Oleic acid is a major component of blood NEFA in fish and plasma concentrations can reach 600  $\mu\text{M}$  in female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*; Ballantyne et al., 1996). Given the effects of this FA on *in-vivo* cardiac performance (Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted), the aim of the present study was to investigate the hypothesis that unesterified OA has direct effects upon calcium transport in sea bass ventricular myocytes. To this end, the whole-cell configuration of the patch clamp technique was employed to investigate the electrophysiological properties of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel.

---

## Materials and Methods

### *Animals*

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with a mean ( $\pm$  SE) mass of  $266 \pm 18$  g were obtained from a commercial supplier on the Ile de Ré (Charente Maritime, France). They were maintained in 1 m<sup>2</sup> fibreglass tanks (water volume approximately 400 L) provided with biofiltered seawater (SW) at a salinity of 30‰ and a temperature of 20 °C. Fish were subjected to a natural photoperiod and fed with commercial fish food daily. They were acclimated to these conditions for one month prior to the experiments.

### *Ventricular cardiomyocyte isolation*

Bass were anaesthetized with tricaine methane sulphonate (MS-222) at a concentration of 0.1g L<sup>-1</sup> and their heart rapidly excised. Single ventricular cells were obtained by enzymatic dissociation using a protocol derived from that described by Vornanen (1997). Briefly, a cannula was inserted through the bulbus arteriosus into the ventricle and hearts rinsed for 2 min with a control solution (in mM): NaCl 130, CsCl 5.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.04, MgSO<sub>4</sub> 2.5, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 10, Hepes 10 (pH 7.6). Following the rinsing, hearts were perfused with a Ca<sup>2+</sup>-free solution, to disrupt Ca<sup>2+</sup>-dependent cellular bonds. The Ca<sup>2+</sup>-free solution contained (in mM): NaCl 100, KCl 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 6.7, taurine 50, glucose 20, Hepes 10, EGTA 0.1 (pH 7.1). Hearts were then perfused for 15 min with the Ca<sup>2+</sup>-free solution complemented with collagenase (Type IA, 0.36 mg.ml<sup>-1</sup>), trypsin (Type III, 0.24 mg.ml<sup>-1</sup>) and BSA (100 mM). Following enzymatic treatment, the ventricle was cut into small pieces and dissociated with a Pasteur pipette in the calcium free solution. Ca<sup>2+</sup> was then slowly increased by adding the control solution progressively. Cells were

kept in the control solution at 20°C and used for patch clamp experiments within 36h. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France).

### ***Recording of $I_{Ca,L}$***

The whole-cell patch-clamp technique was used to study the effects of OA on the electrophysiological properties of the L-type  $Ca^{2+}$  channel. Only calcium-tolerant myocytes with clear striations (Capacitance =  $41.04 \pm 1.06$  pF, n= 38) were used for experiments. Voltage clamp experiments were performed using an Axopatch 200B amplifier with a CV 203BU headstage (Axon instrument, Ca, USA). Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Clark electromedical instrument, Pangbourne, England) using a model P-97 Flamming/Brown micropipette puller (Sutter instrument company, Novato, Ca, USA) and had a resistance of 2-4 M $\Omega$  when filled with pipette solution. Junction potentials were zeroed prior to seal formation. Currents were filtered at 2 kHz and analyzed using Pclamp 9 software.

### ***Materials***

Current recordings were made from the same myocyte before, during, and after exposure to OA. During experiments, various concentrations of OA were rapidly applied to the solution perfusing the cell, by means of a microperfusion device. Myocytes were perfused at a rate of ~300  $\mu$ l/min. Oleic acid (obtained from sigma) was dissolved in 95% ethanol at a concentration of 30 mM and stored under a nitrogen atmosphere at -20°C before use. The experimental concentrations of the FA were obtained by dilution of the stock, and contained negligible ethanol (lower than 0.1 %). The pipette solution for recording  $I_{Ca,L}$  contained (in mM): CsCl 130, MgCl<sub>2</sub> 1, Oxaloacetate 5, Succinate 5, MgATP 5, TEA-Cl 15, EGTA 5, Hepes 10, (pH, 7.2). The bathing and control perfusion

solutions contained (in mM): NaCl 130, CsCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1, BaCl<sub>2</sub> 5, glucose 10, Hepes 10, tetrodotoxin (TTX) 0.001 (pH 7.6). Caesium and TTX was added to inhibit the potassium and sodium currents, respectively. Ba<sup>2+</sup> was chosen instead of Ca<sup>2+</sup> to suppress residual outward currents due to Ca<sup>2+</sup>-mediated permeabilities. To control for any potential effects of ethanol, control perfusates contained the same proportion of ethanol as the OA perfusates (below 0.1 %).

### *Data analysis*

Under voltage clamp conditions, cells were held at -80 mV and stepped in 10 mV increments for 300 ms from -60 mV to 50 mV. Current density, pA/pF, of I<sub>Ca,L</sub> of single ventricular myocytes was calculated by divided the amplitude of the peak current by the cell membrane capacitance. The relative current of I<sub>Ba,L</sub> after the treatment of OA was calculated as I<sub>(OA)</sub>/I<sub>(control)</sub> from the same cell.

The steady-state activation curves were estimated from the relative membrane conductance as a function of potential as  $G_{Ba} = I_{Ba} / (V_m - V_{rev})$  where  $G_{Ba}$  is the peak conductance,  $I_{Ba}$  the peak of calcium current for the test potential  $V_m$ , and  $V_{rev}$  the apparent reversal potential of the calcium current. The steady state inactivation curves were obtained using a two-pulse protocol. A 1.2 s depolarizing conditioning pulse to different voltages from -90 mV to 60 mV (increments of 10 mV) was followed by a 300 ms test pulse to the voltage at witch the maximal L-type barium current were obtained (0 mV). Conditioning and test pulse were separated by a 10 ms return to the holding potential (-90 mV). The activation, inactivation and conductance data were fitted with the simple Boltzmann function  $(I/I_{max} = \{1 + \exp[(V_m - V_{0.5})/K]\}^{-1})$ . The dose-response relationships of OA suppression of I<sub>Ca,L</sub> was fitted to Hill equation  $f(x) = A / (1 + (IC_{50}/x)^h)$ , where A is maximal effect , IC<sub>50</sub> is the OA concentration

required to give half of the maximal effect and  $h$  is the Hill factor. All experiments were performed at a room temperature of 20-23°C.

Statistical analysis was performed with either the student's  $t$  test or analysis of variance (ANOVA). Values of  $P < 0.05$  were considered significant. Statistical data were given as mean  $\pm$  SEM values.

## **Results**

Figure 1A1 shows an example of typical Barium current evoked, in a single seabass ventricular myocyte, by a step in membrane potential from a holding potential of -80 mV to 0 mV, and the effect of 30  $\mu$ M OA on this current. In this cell, 30  $\mu$ M OA applied to the extracellular solution decreased the peak amplitude by 31.42 % after approximately 5 min of perfusion, without causing a change in time to peak (Fig.1A2). The residual inward current elicited from -80 to 0 mV was completely abolished after addition of 3  $\mu$ M nifedipine ( $n = 3$ ), a dihydropyridine  $Ca^{2+}$  channel antagonist (Fig 1A2). Under these experimental conditions, the absence of the insensitive-nifedipine inward current indicated that the barium current was not carried by T type  $Ca^{2+}$  channels. Contrary to the L-type  $Ca^{2+}$  channels, dihydropyridine calcium-channel blockers do not affect the T-type  $Ca^{2+}$  channels of cardiac myocytes (see Bean 1989 for a review).

Fig. 1B illustrates the time course of OA-induced suppressant effects on the  $I_{Ba,L}$  peak amplitude elicited by clamp from -80 to 0 mV, for four different OA concentrations.

In the absence of OA (control), the current increased transiently during the first 2 min and slowly decreased by  $8.63 \pm 5.65$  % ( $n = 4$ ) at 6 min. This weak reduction, which was not statistically significant, indicated that the "run-down" process of the inward  $Ca^{2+}$  current previously reported in mammalian myocytes is slow in the bass cardiomyocytes. In a similar manner, OA at low concentrations (5  $\mu$ M) did not have a marked inhibitory effect

on the amplitude after 5 and 6 minutes of perfusion. However, the application OA at 10, 30 and 100  $\mu\text{M}$  for 5 min induced a significant reduction in  $I_{\text{Ba,L}}$ . Interestingly, the more concentrated was the OA, the earlier the significant reduction in  $I_{\text{Ba,L}}$  appeared. Indeed, 100, 30 and 10  $\mu\text{M}$  OA induced a significant reduction of  $I_{\text{Ba,L}}$  peak amplitude after 1, 3 and 5 minutes of OA application, respectively.

Figure 1C shows the concentration-dependent curve of suppression of  $I_{\text{Ba,L}}$  by OA, at 5 min of perfusion. The decrease in  $I_{\text{Ba,L}}$  was  $7.39 \pm 6.48$  ( $n = 3$ ),  $19.42 \pm 5.79$  ( $n = 4$ ),  $42.52 \pm 7.15$  ( $n = 10$ ) and  $48.96 \pm 5.22$  % ( $n = 6$ ) for OA at 5, 10, 30 and 100  $\mu\text{M}$ , respectively. The reduction in  $I_{\text{Ba,L}}$  was significantly higher ( $P < 0.05$ ) for OA at 100  $\mu\text{M}$  and 30  $\mu\text{M}$  than for OA at 5  $\mu\text{M}$  or 10  $\mu\text{M}$ . Note that even at the highest concentrations of OA, the inward current was not fully blocked. Fitting the dose-response curve with the Hill equation yielded a half-effect concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of  $12.49 \pm 0.27$   $\mu\text{M}$  and a Hill factor of  $1.97 \pm 0.07$ . Figure 2A illustrates the current/voltage relationships for  $I_{\text{Ba,L}}$  in the absence of OA or after 5 minutes of 30  $\mu\text{M}$  OA perfusion. The amplitude of the peak current was normalized by cell capacitance and was plotted as a function of voltage. The whole cell inward current exhibited  $I_{\text{Ba,L}}$  properties with a threshold potential at about -40 mV and a maximum at 0 mV. Under control conditions, maximum current-density was  $11.5 \pm 0.95$  pA/pF. The application of 30  $\mu\text{M}$  OA significantly reduced  $I_{\text{Ba,L}}$  density, to about 45% of its control level ( $P < 0.01$ ). However, the shape of the current-density voltages relation was unaffected by OA; there was no shift in activation or maximal peak current potential. The apparent reversal potential estimated by extrapolation from potentials between 0 and 30 mV was not significantly different between control and 30  $\mu\text{M}$  OA, being  $35.64 \pm 1.33$  mV and  $31.78 \pm 3.37$  mV respectively, indicating that the FA did not alter the selectivity properties of the current. Figure 2C shows the evolution of conductance (see methods) divided by membrane capacitance (nS/pF), plotted against the membrane potential. The

---

curves which have been constructed from the current/voltage relationships represented in Fig. 2A (see methods) revealed that the conductance decreased significantly ( $P < 0.05$ ) with 30  $\mu\text{M}$  OA at voltages greater than  $-20$  mV, when compared with the control. Maximum conductance was significantly lower in the presence of 30  $\mu\text{M}$  OA ( $0.20 \pm 0.03$  nS/pF;  $n = 9$ ) than in control conditions ( $0.32 \pm 0.02$  nS/pF;  $n = 11$ ).

Figure 3 compares the steady state inactivation and activation curves of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in controls and after 5 min of 30  $\mu\text{M}$  OA application. Curve-fitting (see methods) indicated that there was no significant difference between the control and 30  $\mu\text{M}$  OA midpoint potentials ( $V_{1/2}$ ) for inactivation ( $-25.99 \pm 1.23$  mV and  $-28.06 \pm 1.55$  mV, respectively). In a similar manner, midpoint potentials for activation were not significantly different between control and 30  $\mu\text{M}$  OA ( $-15.74 \pm 0.82$  and  $16.23 \pm 0.71$  mV, respectively). Additionally, no significant difference between control and 30  $\mu\text{M}$  OA was observed between maximum inactivation or maximum activation. Inactivation and activation slope parameters ( $K$ ) were not significantly different between control ( $5.74 \pm 0.32$  and  $4.76 \pm 0.26$ , respectively) and in the presence of 30  $\mu\text{M}$  OA (respectively  $6.01 \pm 0.71$  and  $4.99 \pm 0.35$ ). Steady-state inactivation began around  $-50$  mV, with maximum inactivation reached around  $10$  mV. Steady-state activation began at voltages greater than  $-40$  mV, with a peak around  $10$  mV. The superposition of voltage-dependence for the activation and inactivation of inward currents revealed that there was a voltage range within which the activation and inactivation curves overlapped. This overlap was estimated between  $-40$  and  $0$  mV and maximal between  $-16$  and  $-18$  mV

---

**Discussion**

The present study is the first to investigate potential effects of NEFA on ion transport by fish cardiac myocytes. The data reveal that unesterified OA exerts a direct suppressant effect upon barium currents through calcium channels. The suppression of the whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$  currents evoked by a voltage step to 0 mV from holding potential of -80 mV was dose-dependent, with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $12.49 \pm 0.27 \mu\text{M}$ . At a NEFA concentration of 30  $\mu\text{M}$ , OA significantly reduced the current density to  $42.52 \pm 7.15 \%$  without altering either the shape of the current-density voltage relationships or the apparent reversal potential. Although we have no information on the concentration of unesterified OA in the fish cardiac cell environment, the mean circulating OA concentration measured in sockeye salmon ranged between 156 and 609  $\mu\text{M}$ , depending upon the migratory period and the sex of the fish (Ballantyne et al., 1996). Thus, the concentrations we used were in the physiological range.

The effects of OA on the seabass cardiac myocytes are consistent with the findings of Shimada and Somlyo (1992), who demonstrated that unesterified OA can induce a decrease in  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  in rabbit intestinal smooth muscle. Xiao et al. (1997) reported that 5  $\mu\text{M}$  of OA had no effect on  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$  in neonatal rat cardiomyocytes. This result is not, however, incompatible with our findings, whereby the effect of OA was concentration dependent and only became significant above concentrations of 10  $\mu\text{M}$ . Nevertheless, these results differ from those reported by Huang et al. (1992) in guinea pig ventricular myocytes. In that myocyte preparation, 3  $\mu\text{M}$  of OA induced a large transient increase in  $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ , the low  $\text{Ca}^{2+}$  inward current began to increase at 2 min, reached a plateau in 14 min, and then started to decrease after 25 min of perfusion. There are a number of studies showing that unesterified n-3 PUFA, specifically EPA and DHA, can modulate L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian hearts (Xiao et al. 1997; Pepe et al., 1994; Hallaq et al. 1992; Ferrier et al.,

2002). Concentrations of 5  $\mu\text{M}$  induced a large and significant decrease in  $I_{\text{Ca,L}}$  of 83 % and 62 % for EPA and DHA, respectively (Xiao et al. 1997). Our study shows that OA has similar effect but of a lesser magnitude than EPA and DHA, with a maximum inhibition of  $49 \pm 5$  % at 100  $\mu\text{M}$  of OA.

The mechanism of action of NEFA on  $\text{Ca}^{2+}$  channels is not well understood. However, during the past decade, Andersen and colleagues have been developing and testing a hypothesis that FA and other small ligands can affect ion channels primarily by acting on the cell membrane in the immediate surrounding of the channel protein. (Nielsen and Andersen, 2000; Lundbaek and Andersen, 1999; Lundbaek et al., 2004). They have hypothesised that if the hydrophobic length of the channel protein does not match the hydrophobic thickness of the membrane phospholipid bilayer, the mismatch would create stresses between the channel protein and the membrane bilayer. This would affect the conformational state of the membrane segment of the channel protein, leading to a change in its conductance. Thus, the decrease in conductance of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in presence of OA observed in our study may be a consequence of this mechanism.

At high temperature, rainbow trout hearts become arrhythmic (Heath and Hughes, 1973). Farrell (2002) hypothesized that oxygen supply may become insufficient to meet cardiac oxygen demand at high temperatures, inducing cardiac dysfunction. Work on mammals has demonstrated that when oxygen falls below a critical level in the cytoplasm, it can induce an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (reviewed in Carmeliet, 1999). This  $\text{Ca}^{2+}$  excess produces arrhythmogenic transient inward currents ( $I_{\text{t}_i}$ ) which depolarize the cell membrane, generating delayed after depolarizations. This is assumed to reflect at least three components, one supported by  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange (Verkerk et al. 2001), a second comprising a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -activated chloride current (Verkerk et al. 2000), and a third component which is carried by non-selective cation channels (Guinamard et al. 2004).

---

In our study, OA induced a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the sarcolemma via L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, an effect that could modulate  $\text{I}_{\text{t}}$ . Therefore, OA may have a protective effect against  $\text{Ca}^{2+}$  overload and consequent arrhythmias. This is in accord with the study of Mackay and Mochly-Rosen (2001), where 40  $\mu\text{M}$  of OA appeared to protect cardiac myocytes from prolonged ischemia. It was also observed that OA appear to be able to reduce  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum (Honen et al. 2003). In the seabass, it would be interesting to extend the current observations by investigating the effects of OA on free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

In the majority of teleost species, the major oxygen supply to the heart is from venous blood. During exercise, there is an increase in myocardial oxygen demand while the venous blood oxygen content decreases. If oxygen demand exceeds supply, then maximum cardiac performance could become limited because of myocardial hypoxia (reviewed in Farrell, 2002). In a previous study on seabass, we found that increasing the tissue levels of OA, by feeding with appropriate dietary oils, led to increased maximum cardiac output and scope for cardiac work during a swim test (Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted). Indeed, a significant positive relationship was revealed between cardiac OA content and the capacity to increase cardiac output during exercise to fatigue by incremental increases in swimming speed (a standard Ucrit test, Brett 1964). During these experiments cardiac output was monitored with a ventral aortic flow probe, and visual observation of the probe trace revealed cardiac arrhythmias as the fish approached fatigue. The fish fed with a diet rich in OA swam to significantly higher speeds prior to fatigue, and these arrhythmias did not, therefore, appear until higher rates of cardiac output had been achieved (Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted). Thus, a direct effect of OA upon

Ca<sup>2+</sup> transport in ventricular myocytes could be responsible, at least in part, for the observed differences in *in-vivo* cardiac performance (Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinnet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino Infante, J. L. and Claireaux, G., manuscript submitted), by reducing susceptibility to cardiac arrhythmias induced by myocardial hypoxia at high exercise intensities. This is an interesting area for further studies.

In conclusion, this is the first demonstration that NEFA can have direct effects upon ion transport in fish cardiac myocytes. The suppression of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel achieved with OA in seabass ventricular myocytes was less than that achieved by similar doses of EPA and DHA in mammals (Xiao et al. 1997). The effects of OA may be beneficial for the seabass *in-vivo*, protecting against Ca<sup>2+</sup> overload and consequent arrhythmias induced by myocardial hypoxia. This possibility would be consistent with the observed beneficial effects of OA on *in-vivo* cardiac performance during high-intensity exercise. The dietary intake of cardioprotective FA, such as OA, may also have beneficial effects in situations other than high intensity exercise, for example when water temperature is elevated or when water oxygen content is low. These situations may frequently be encountered by migrating and foraging seabass, so the impact of dietary FA in such teleost species deserves further study.

### **Acknowledgements**

The authors thank J-F. Faivre and R. Guinamard for stimulating discussions. AC was funded by a doctoral fellowship from IFREMER and the “Conseil Régional Poitou-Charentes”. We are indebted to the Aquarium of La Rochelle, for their technical assistance in different stages of the experiments.

**References cited**

- Agnisola, C., McKenzie, D. J., Taylor, E. W., Bolis, C. L. and Tota, B.** (1996). Cardiac performance in relation to oxygen supply varies with dietary lipid composition in sturgeon. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* **271.40**, 417-425.
- Aho, E. and Vornanen, M.** (1999). Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* **202**, 2663-2677.
- Ballantyne, J. S., Mercure, F., Gerrits, M. F., Van Der Kraak, G., McKinley, S., Martins, D. W., Hinch, S. G. and Diewert, R. E.** (1996). Plasma nonesterified fatty acid profiles in male and female sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, during the spawning migration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 1418-1426
- Bean, B. P.** (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 367-384.
- Brett, J. R.** (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **21**: 1183-1226
- Carmeliet, E.** (1999). Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol. Rev.* **79.3**, 917-1017.
- Coyne, M. D., Kim C. S., Cameron J. S. and Gwathmey J. K.** (2000). Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, 1535-1544.
- Driedzic, W. R. and Gesser, H.** (1988). Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. *J. Exp. Biol.* **140**, 227-241.

- Farrell, A. P.** (2002). Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: Insight into cardiovascular design limitations in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **132.A**, 797-810.
- Ferrier, G. R., Redondo, I., Zhu, J. and Murphy, M. G.** (2002). Differential effects of docosahexaenoic acid on contractions and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in adult cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **54**, 601-610.
- Fischmeister, R. and Horackova, M.** (1983). Variation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  following  $\text{Ca}^{2+}$  current in heart. A theoretical study of ionic diffusion inside a cylindrical cell. *Biophys. J.* **41**, 341-348.
- Guinamard, R., Chatelier, A., Demion, M., Potreau, D., Patri, S., Rahmati, M. and Bois, P.** (2004). Functional characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J. Physiol.* **558.1**, 75-83.
- Hallaq, H., Thomas, W. S. and Leaf, A.** (1992). Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channel in heart cells by fish oil fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1760-1764.
- Heath, A. G. and Hughes, G. M.** (1973). Cardiovascular and respiratory changes during heat stress in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* **59**, 323-338.
- Honen, B. N., Saint, D. A. and Laver, D. R.** (2003). Suppression of calcium sparks in rat ventricular myocytes and direct inhibition of sheep cardiac RyR channels by EPA, DHA and Oleic Acid. *J. Membrane. Biol.* **196**, 95-103.
- Huang, J. M. C., Xian, H. and Bacaner, M.** (1992). Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6452-6456.
- Liu, L., Barrett, C. F. and Rittenhouse, A. R.** (2001). Arachidonic acid both inhibits and enhances whole cell calcium currents in rat sympathetic neurons. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **280**, 1293-1305.

- Lundbaek, J. A. and Andersen, O. S.** (1999). Spring constants for channel-induced lipid bilayer deformations estimates using gramicidin channels. *Biophys. J.* **76**, 889-895.
- Lundbaek, J. A., Birn, P., Hansen, A. J., Sogaard, R., Nielsen, C., Girshman, J., Bruno, M. J., Tape, S. E., Egebjerg, J., Greathouse, D. V. et al.** (2004). Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of Hydrophobic coupling. Effects of micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J. Gen. Physiol.* **123**, 599-621.
- Mackay, K. and Mochly-Rosen, D.** (2001). Arachidonic acid protects neonatal cardiac myocytes from ischemic injury through  $\epsilon$  protein kinase C. *Cardiovasc. Res.* **50**, 65-74.
- McKenzie, D. J.** (2001). Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **128.A**, 607-621.
- McKenzie, D. J., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S., Deacon, G. and Randall, D. J.** (1998). Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Fish Physiol. Biochem.* **19**, 111-122.
- Morad, M., Goldman, Y. E. and Trentham, D. R.** (1981). Rapid photochemical inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists shows that  $\text{Ca}^{2+}$  entry directly activates contraction in frog heart. *Nature* **304**, 635-638.
- Nair, S. S. D.; Leitch, J. W., Falconer, J. and Garg, M. L.** (1997). Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J. Nutr.* **127**, 383-393.
- Negretti, N., Pérez, M. R., Walker, D. and O'Neill, S. C.** (2000). Inhibition of sarcoplasmic reticulum function by poly-unsaturated fatty acids in intact, isolated myocytes from rat ventricular muscle. *J. Physiol.* **523.2**, 367-375.

- Nielsen, C. and Andersen, O. A.** (2000). Inclusion-induced bilayer deformations: Effects of monolayer equilibrium curvature. *Biophys. J.* **79**, 2583-2604.
- Pepe, S., Bogdanov, K., Hallaq, H., Spurgeon, H. and Leaf, A.** (1994).  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , and contraction in adult rat cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8832-8836.
- Pepe, S. and McLennan, P. L.** (2002). Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation* **105**, 2303-2308.
- Pickett, G. D. and Pawson, M. G.** (1994) Sea bass. Biology, exploitation and conservation. In: *Fish and Fisheries series, 12* (ed. Chapman and Hall), pp. 337. London.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. and Estevez, A.** (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* **177**, 191-199.
- Sergiel, J.-P., Martine, L., Raederstorff, D., Grynberg, A. and Demaison, L.** (1998). Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**, 728-736.
- Shimada, T. and Somlyo, A. P.** (1992). Modulation of voltage-dependant Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* **100**, 27-44.
- Swan, J. S., Dibb, K., Negretti, N., O'Neill, S. C. and Sitsapesan, R.** (2003). Effects of eicosapentaenoic acid on cardiac SR  $\text{Ca}^{2+}$ -release and ryanodine receptor function. *Cardiovasc. Res.* **60**, 337-346.

- Thomas, M. J., Hamman, B. N. and Tibbits, G. F.** (1996). Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish and hagfish. *J. Exp. Biol.* **199**, 1999-2009.
- Van Der Vusse, G. J., Glatz, J. F. C., Stam, H. C. G. and Reneman, R. S.** (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.* **72.4**, 881-940.
- Verkerk, A., Veldkamp, M. W., Baartscheer, A., Schumacher, C. A., Klopping, C., Van Ginneken, A. C. And Ravesloot, J. H.** (2001). Ionic mechanism of delayed afterdepolarizations in ventricular cells isolated from human end-stage failing hearts. *Circulation* **104**, 2728-2733.
- Verkerk, A. O., Veldkamp, M. W., Bouman, L. N. and Van Ginneken, A. C.** (2000). Calcium activated  $\text{Cl}^-$  current contributes to delayed afterdepolarizations in single purkinje and ventricular myocytes. *Circulation* **101**, 2639-2644.
- Vornanen, M.** (1997). Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **272**, 1432-1440.
- Xiao, Y. F., Gomez, A. M., Morgan, J. P., Lederer, W. J. and Leaf, A.** (1997). Suppression of voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4182-4187.

---

**Figure legends**

**Figure 1.** Effect of OA on the voltage-activated L-type current carried by barium in sea bass ventricular myocytes. The current was elicited by a step in membrane potential to 0 mV from a holding potential of -80 mV (insert) during 300 ms (A) Superimposed traces show responses of a cell in control solution, after 5 min exposure to 30  $\mu$ M OA (A1) and 3  $\mu$ M nifedipine (A2) (capacitance = 40.71 pF). (B) Time course of the inhibitory effect of OA on the peak  $I_{Ba,L}$ . Peak currents were normalised to their initial peak current recorded at  $t = 0$  min of perfusion and are expressed as mean  $\pm$  SEM. Control perfusion without OA ( $n = 11$ ) are shown as black crosses. Concentrations of OA of 5 ( $n = 3$ ), 10 ( $n = 4$ ), 30 ( $n = 10$ ) and 100  $\mu$ M ( $n = 6$ ) are represented by green squares, yellow triangles, red diamonds and blue circles, respectively. Values are mean  $\pm$  SEM, significant differences between control and the different OA concentrations is represented by \* for  $P < 0.05$  and \*\* for  $P < 0.01$ . (C) Concentration-dependence of inhibition by OA on  $I_{Ba,L}$  after 5 minutes of perfusion. The number of cells treated with OA 5, 10, 30 and 100  $\mu$ M is 3, 4, 10 and 6, respectively. The line was obtained by fitting data to the Hill equation (see methods) which gave an  $IC_{50}$  of  $12.49 \pm 0.27$   $\mu$ M and a Hill factor of  $1.97 \pm 0.07$ . Values are mean  $\pm$  SEM. Dissimilar letters indicated a significant difference ( $P < 0.05$ ) of  $I_{Ba,L}$  diminution between the different OA concentrations.

**Figure 2.** Effect of OA on density-voltage and conductance-voltage relationships

Current density-voltage relationships were plotted for the L type inward current of sea bass ventricular myocytes in controls (Black cross,  $n = 11$ ) and in the presence of 30  $\mu$ M OA (red diamond,  $n = 9$ ). (B) Conductance-curves constructed from density-voltage curves in

(A). Values are mean  $\pm$  SEM, significant difference between control and the different OA concentrations is represented by \* for  $P < 0.05$  and \*\* for  $P < 0.01$ .

**Figure 3.** Steady-state activation (A) and inactivation (B) curves of calcium channels in control and after 5 minutes of perfusion with 30  $\mu\text{M}$  OA. Current amplitude were normalised to maximum current and plotted against holding potential. Data were fit using the appropriate form of the Boltzmann equation (see methods). Individual ventricular myocytes used for inactivation and activation curves were respectively 3 and 11 for control and 4 and 9 for 30  $\mu\text{M}$  OA. \* indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) between control and the application of 30  $\mu\text{M}$  OA.

Figure 1.

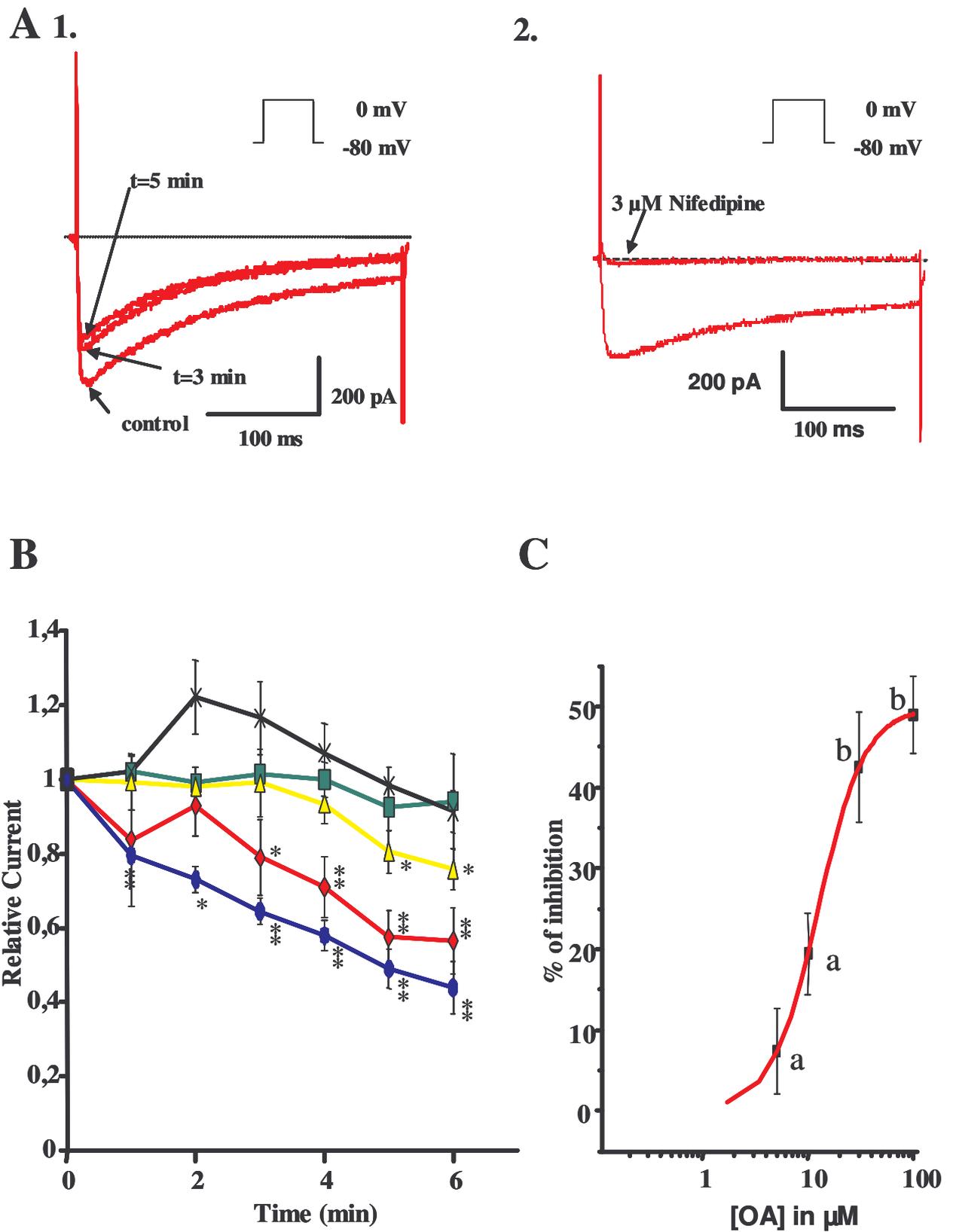


Figure 2.

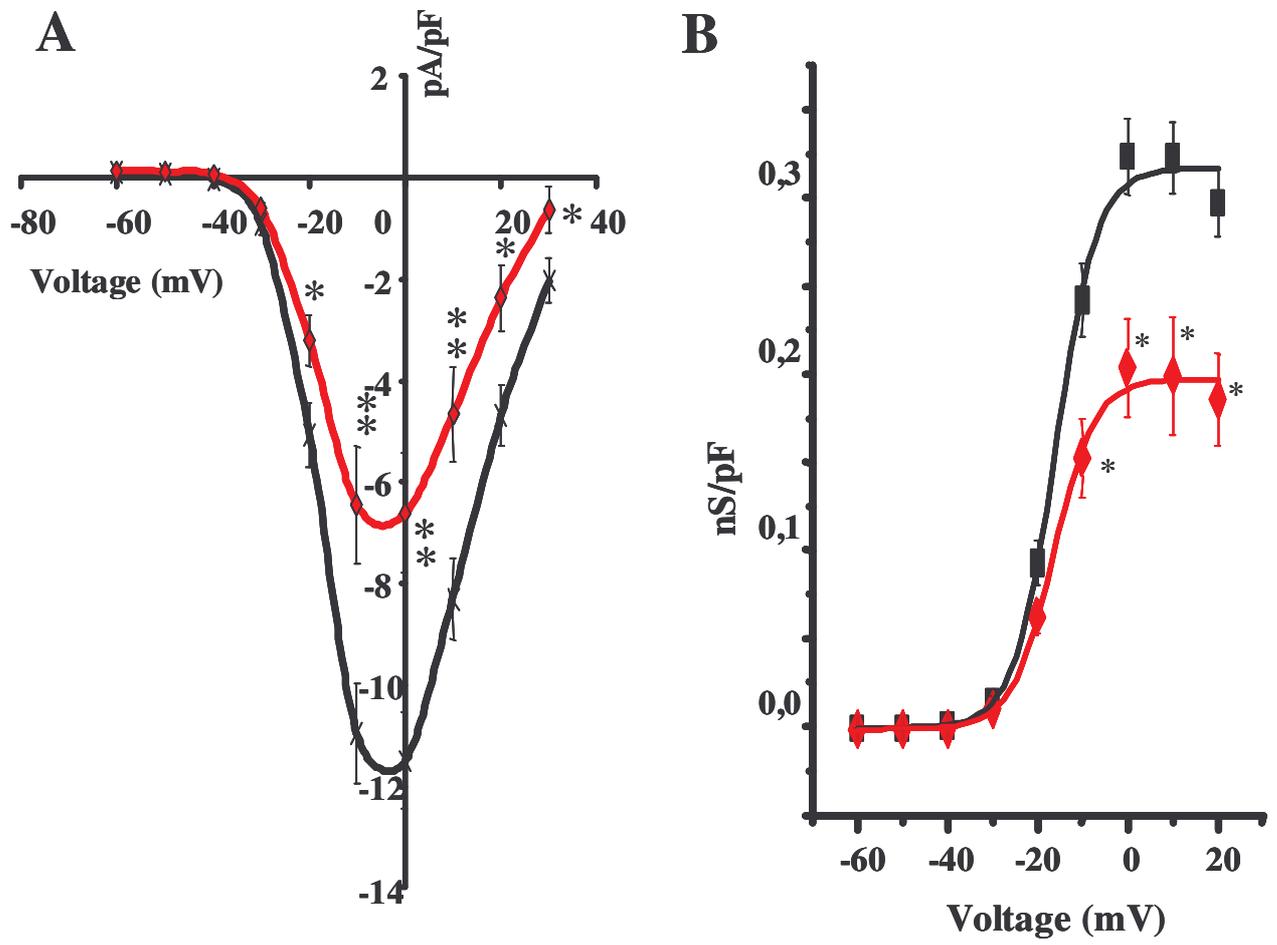
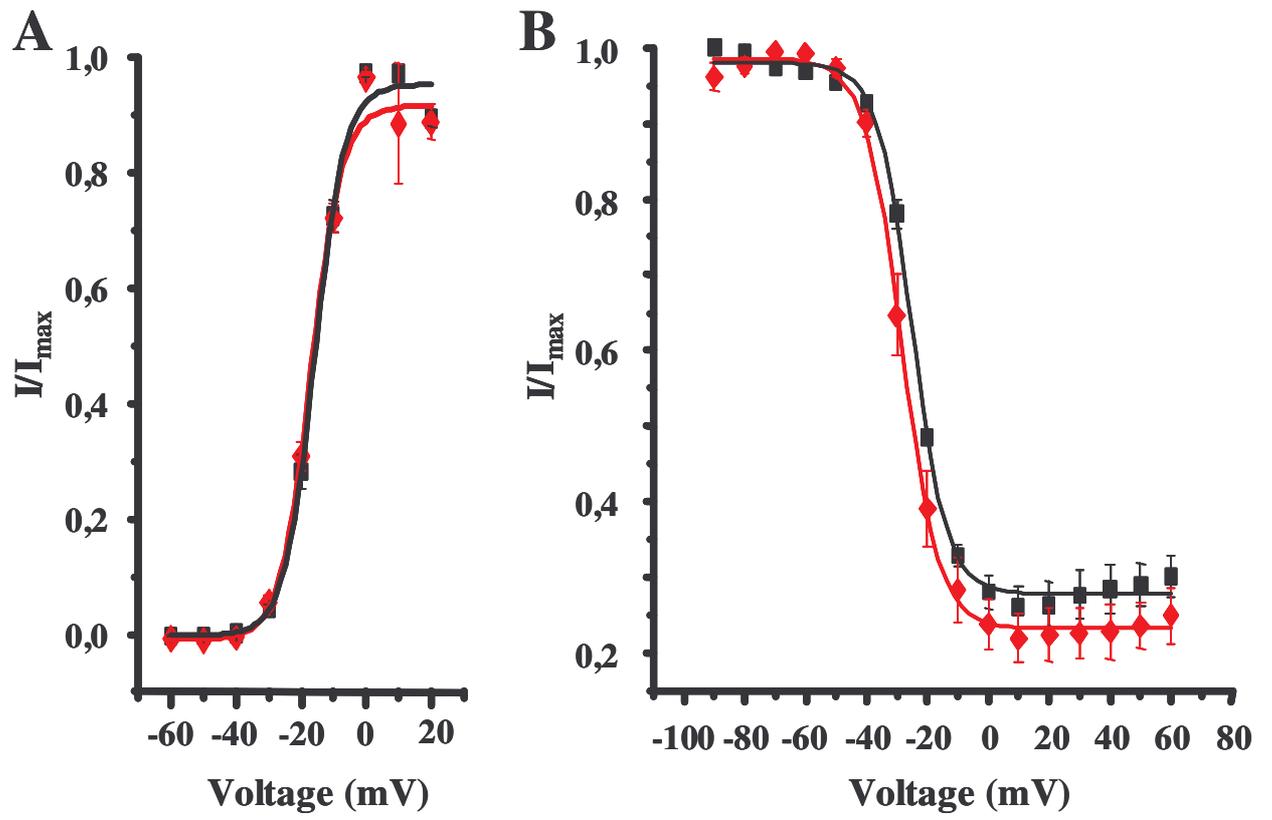


Figure 3.



## *Chapitre II-2*

---

Effet d'une alimentation riche en acides gras mono-insaturés sur les propriétés biophysiques du courant calcique de type L des myocytes ventriculaires cardiaques du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)

---

## **Effet d'une alimentation riche en acides gras mono-insaturés sur les propriétés biophysiques du courant calcique de type L des myocytes ventriculaires cardiaques du bar européen (*Dicentrarchus labrax*)**

---

### **Introduction**

La teneur en Ag de l'alimentation se répercute sur la composition en Ag du tissu cardiaque (Agnisola et al., 1996; Charnock et al., 1992; Al Makdessi et al., 1995). Comme nous avons pu le mettre en évidence précédemment (voir chapitre I-1), les bars nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA présentent une plus grande quantité en n-3 PUFA dans le tissu cardiaque. De la même façon, un apport alimentaire riche en OA augmente le taux de ces mêmes Ag dans les membranes des cardiomyocytes. Une telle modification de la composition en Ag des membranes cellulaires cardiaques est susceptible d'avoir une influence sur la physiologie cardiovasculaire. En effet, en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée, du nombre de doubles liaisons et de leur forme moléculaire, les acides gras vont modifier les propriétés biophysiques des membranes cellulaires (Stillwell et Wassall, 2003, Ehringer et al., 1990). De ce fait, l'activité des protéines transmembranaires comme les canaux ioniques est susceptible d'être influencée par les modifications structurales de la membrane plasmique.

Le calcium est un ion fondamental intervenant dans les processus de contraction cellulaire. Chez les vertébrés inférieurs comme les poissons, l'entrée du calcium nécessaire aux processus de contraction, s'effectue principalement par les canaux calciques de type L de la membrane plasmique (Vornanen, 1997; Fischmeister et Horackova, 1983; Morad et al., 1981; Coyne et al., 2000, Thomas et al., 1996). Toutefois, un niveau de calcium trop important peut également être délétère pour les cellules. Une surcharge calcique intracellulaire favorise l'apparition d'arythmies cardiaques et/ou engendre des processus

d'apoptose et/ou de nécrose cellulaire. Ainsi, toutes modifications de l'homéostasie calcique peuvent avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement cardiaque.

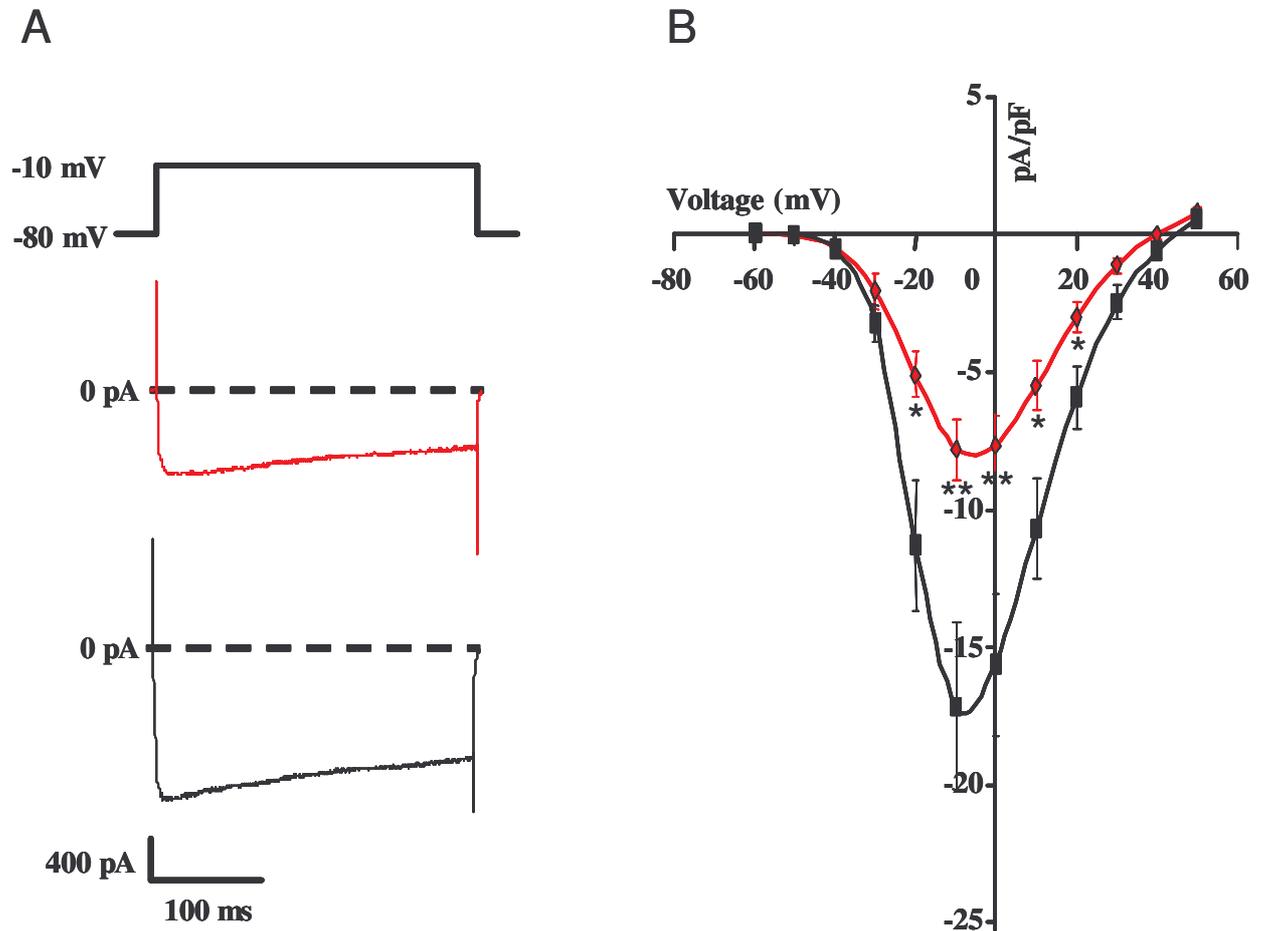
Dans notre étude précédente, présentée dans le chapitre I-1, nous avons montré que des bars nourris avec une alimentation riche en OA possédaient de meilleures performances cardiaques que les bars nourris avec une alimentation riche en n-3 PUFA. Le débit cardiaque maximal des bars était significativement et positivement corrélé avec la teneur en OA du tissu cardiaque. De plus, lors de nos expériences sur l'hypoxie, aucun effet protecteur majeur associé à la présence de n-3 PUFA dans l'alimentation n'a pu être observé contrairement aux études réalisées chez l'esturgeon ou le rat (Agnisola et al., 1996; Pepe et McLennan, 2002). Nous avons également montré dans le chapitre II-1 que la perfusion d'OA non estérifié sur les cardiomyocytes ventriculaires du bar induisait une diminution de  $I_{Ca,L}$ . L'objectif de cette étude est donc de vérifier si le courant calcique lent est également modulé par la composition en Ag des membranes cellulaires. Pour cela, les alimentations HFM (riche en n-3 PUFA) et HC (riche en OA) ont été utilisées afin de comparer les effets sur le canal calcique de type L, de membranes riches en n-3-PUFA par rapport à des membranes riches en OA. Les deux régimes et le protocole d'alimentation des poissons sont les mêmes que ceux utilisés au cours des études sur la nage et la tolérance à l'hypoxie des poissons (Chapitre I). La composition en Ag du tissu cardiaque est présentée dans le chapitre I-1. Comme précédemment, le calcium extracellulaire a été remplacé par du baryum afin de s'affranchir des conductances résiduelles éventuelles dépendantes du calcium. L'étude du courant  $I_{Ba,L}$  est réalisée à 20°C par la technique du patch clamp en configuration «whole-cell».

## Résultats

La figure (R 6 A) montre un exemple représentatif de courants baryum enregistrés en configuration «whole-cell» sur des myocytes ventriculaires de bars nourris avec une alimentation enrichie en HFM ou en HC. Ces courants sont obtenus par une dépolarisation membranaire d'un potentiel maintenu de -80 mV à potentiel de -10 mV pendant 300 ms. L'amplitude du courant enregistré sur le cardiomyocyte de bar HFM est 3,62 fois plus élevée que celle obtenue sur le myocyte du bar HC.

La figure R 6 B représente la relation courant/potentiel de  $I_{Ba,L}$  de myocyte de bars nourris avec une alimentation enrichie en HFM (n=8) ou en HC (n=8). Dans les conditions de potentiel imposé, les cellules sont maintenues à -80 mV et le potentiel est augmenté par paliers de 10 mV pendant une durée de 300 ms de -60 mV jusqu'à 50 mV. L'amplitude du courant est normalisée en la divisant par la capacité membranaire. Le courant global entrant présente un potentiel seuil de -50 mV et un courant maximum à -10 mV. La densité de courant maximale obtenue sur les myocytes cardiaques de bars HFM est de  $-17,17 \pm 3,03$  pA/pF. Pour les bars HC, la densité du courant maximale à -10 mV est de  $-7,83 \pm 1,11$  pA/pF. Elle est estimée à 45,60 % de la densité de courant HFM ( $P < 0,01$ ). Néanmoins, il n'y a pas de déplacement du seuil d'activation et du potentiel au pic du courant entre les deux alimentations. Les potentiels d'inversion apparents ne sont pas significativement différents entre les myocytes de bars HFM et HC. Ils sont respectivement de  $43,43 \pm 2,17$  et  $40,17 \pm 2,41$  mV. Ceci montre que les propriétés de sélectivité du courant ne sont pas modifiées d'une alimentation à l'autre.

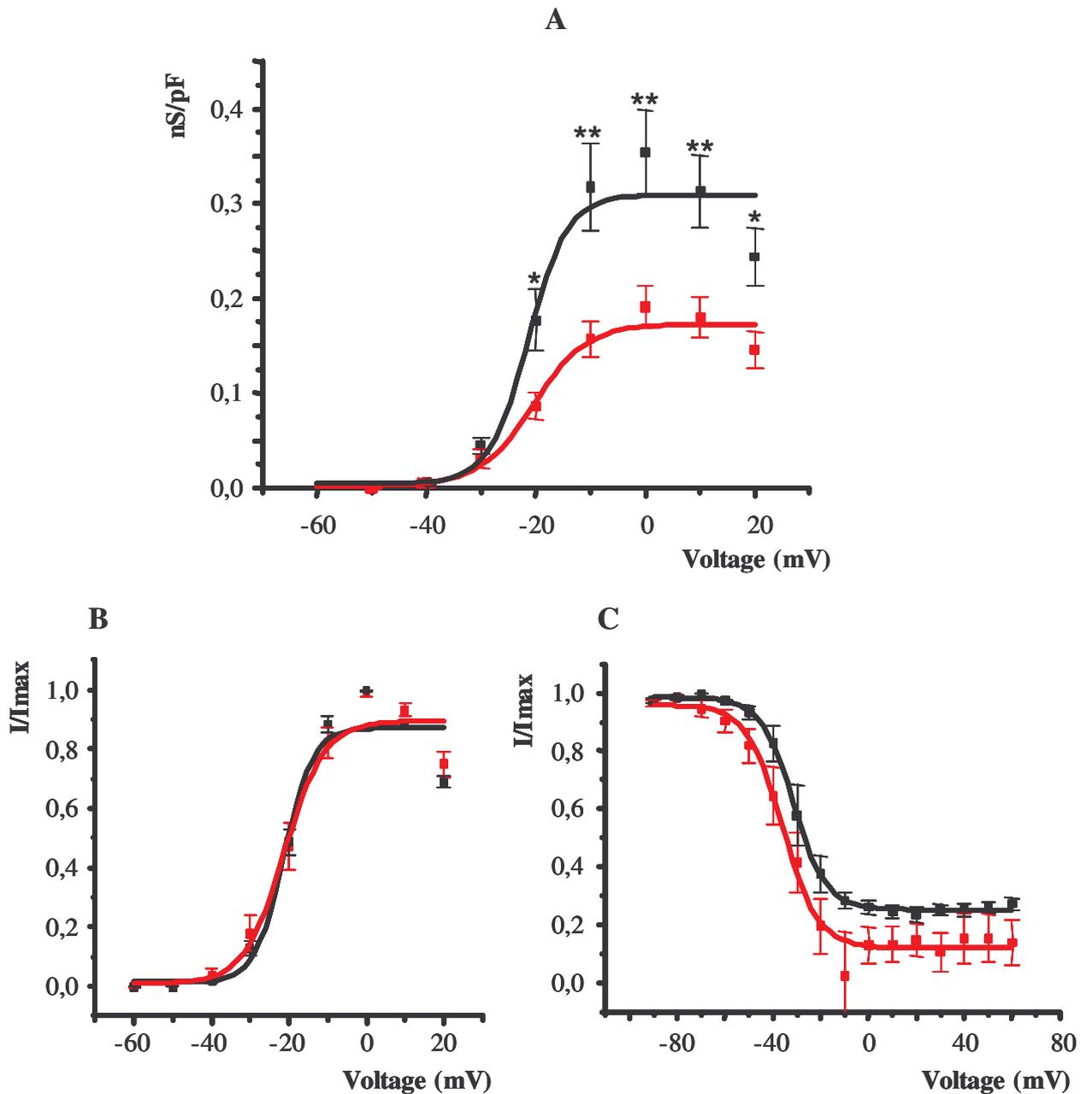
La conductance membranaire a été calculée à partir de l'équation  $G_{Ba} = I_{Ba} / (V_m - V_{rev})$  où  $G_{Ba}$  est la conductance globale au pic de courant,  $I_{Ba}$  le courant baryum mesuré au pic pour le potentiel test  $V_m$  et  $V_{rev}$  le potentiel d'inversion. La figure R 7 A représente l'évolution de la conductance divisée par la capacité membranaire (nS/pF) en fonction du potentiel de membrane. La courbe a été obtenue à partir de l'équation de Boltzman  $(I/I_{max} = \{1 + \exp[(V_m - V_{0,5})/K]\}^{-1})$ . Cette figure montre que la conductance est significativement plus élevée ( $P < 0,05$ ) chez les poissons nourris avec l'alimentation HFM pour des potentiels égaux ou supérieurs à -20 mV. Chez les bars HFM la conductance maximale est

**Figure R 6**

Modulation du courant baryum de type L par l'alimentation. **A**- exemple de courant baryum enregistré à un potentiel de -10 mV pendant une durée de 300 ms. Le tracé noir représente le courant enregistré à partir d'un cardiomyocyte de bar alimenté en HFM. Le tracé rouge à partir d'un bar alimenté en HC. **B**- courbe de la densité de courant baryum globale en fonction du potentiel. La courbe noire est obtenue à partir de cardiomyocytes de bars alimentés en HFM (n = 8). La courbe rouge à partir des bars HC (n = 8). \* (P < 0,05) et \*\* (P < 0,01) indiquent une différence significative entre les deux alimentations.

significativement plus élevée ( $P < 0,01$ ) que celle des bars HC. Elle est respectivement de  $0,35 \pm 0,05$  pS/pF ( $n = 8$ ) et de  $0,19 \pm 0,02$  pS/pF ( $n=8$ ).

Les figures R 7 B et R 7 C comparent les états d'activation et d'inactivation à l'état stable des canaux calciques des bars nourris avec l'alimentation HFM ou HC. Les paramètres d'activation ont été calculés à partir de l'équation de Boltzman. L'activation à l'état stable, estimée à partir de la conductance membranaire, ne présente aucune différence significative entre les alimentations HFM ( $n = 8$ ) et HC ( $n = 8$ ) pour le potentiel de demi-activation (respectivement  $-21,22 \pm 2,05$  mV et  $-21,16 \pm 2,08$ ), ou la pente K (respectivement  $3,74 \pm 2,20$  et  $5,11 \pm 1,91$ ).  $I_{Ba,L}$  s'active pour un potentiel de -40 mV et atteint un pic aux alentours de 0 mV. La courbe d'inactivation est obtenue en utilisant un double créneau de potentiel. Une première dépolarisation, allant d'un potentiel de -90 mV à 60 mV (incrément de 10 mV) et d'une durée de 1,2 s, est suivie par un pulse de 300 ms au potentiel où le courant baryum de type L est maximal. Ces deux pulses sont séparés par une repolarisation à un potentiel de -90 mV pendant 10 ms. L'ajustement de la courbe déterminée par l'équation de Boltzman montre qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les alimentations HFM ( $n = 3$ ) et HC ( $n = 7$ ); pour le potentiel de demi-inactivation (respectivement  $-31,38 \pm 0,32$  mV et  $-36,11 \pm 1,30$  MV) ou pour la pente K (respectivement  $6,89 \pm 0,28$  et  $7,49 \pm 1,13$ ). La gamme de potentiel d'inactivation s'étend de -60 mV (seuil) jusqu'à un maximal vers 0 mV. L'inactivation maximale n'est pas significativement différente entre les alimentations. Le courant de fenêtre (c'est à dire le chevauchement des courbes d'activation et d'inactivation) se situe donc entre -40 et 0 mV.

**Figure R 7**

Effets de l'alimentation sur la conductance, l'activation et l'inactivation du courant baryum de type L. les courbes noires représentent les valeurs obtenues pour les bars nourris avec l'alimentation HFM. Les courbes rouges représentent l'alimentation HC. **A.** Courbes représentant la conductance maximale en fonction du potentiel imposé pour les bars HFM (n = 8) et HC (n = 8). **B.** Courbes d'activation obtenues à partir des cardiomyocytes de bars HFM (n = 8) ou HC (n = 8). **C.** Courbes d'inactivations obtenues à partir des cardiomyocytes de bars HFM (n = 3) ou HC (n = 7). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM. \* et \*\* représentent des différences significatives entre les alimentations (respectivement  $P < 0,05$  et  $P < 0,01$ )

---

## Discussion

Cette étude est la première, à notre connaissance, à montrer un effet de la teneur en Ag de l'alimentation sur l'activité du canal calcique de type L cardiaque. Les poissons nourris avec une alimentation enrichie en HFM possèdent un taux significativement plus élevé d'EPA (20:5 n-3) et un taux significativement inférieur d'OA (18:1 n-9) dans leurs membranes cellulaires par rapport aux poissons nourris avec l'alimentation HC (Chapitre I-1). Dans cette étude, la différence de composition en Ag module le courant calcique lent des cardiomyocytes ventriculaires de bars. En effet, les cellules à forte teneur en EPA présentent une densité de courant entrant lent significativement supérieure à celle enregistrée dans les cardiomyocytes à une forte teneur en OA. Cette différence est la conséquence d'une modification de la conductance globale. Elle est plus élevée dans le cas des cellules riches en EPA ou plus faible dans les cellules à forts taux d'OA. Toutefois, aucune différence significative des paramètres d'activation et d'inactivation des canaux calciques n'a été observée, et ce malgré un léger déplacement de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs pour les cellules riches en OA.

Ces résultats sont similaires à ceux observés lors de notre précédente étude (Chapitre II-1) où la perfusion directe d'acide oléique diminuait la conductance membranaire sans altérer significativement les courbes d'activation et d'inactivation. Toutefois, dans l'expérience précédente, l'OA était perfusé sous sa forme non estérifiée tandis que dans cette étude l'OA est estérifié et intégré dans la membrane cellulaire. Les effets observés sur le courant  $I_{Ba,L}$  pourraient être dus à un mode d'action similaire de l'OA qui passerait notamment par une modification des propriétés biophysiques de la membrane cellulaire. Une des propriétés importantes des membranes cellulaires est leur fluidité. Celle-ci est directement liée à la nature et la composition des Ag de la membrane. En effet, de nombreuses études ont montrés que la fluidité membranaire était en relation étroite avec le degrés d'« insaturation » des Ag membranaires (Stillwell et Wassall, 2003, Ehringer et al., 1990). L'OA est un acide gras mono-insaturé, tandis que l'EPA est un acide gras poly-insaturé comportant cinq doubles liaisons sur sa chaîne carbonée. Ainsi, une membrane cellulaire riche en EPA est supposée être plus fluide qu'une membrane riche en OA. Cette différence de fluidité pourrait être responsable de la variation de densité de  $I_{Ba,L}$  observée. Plus la fluidité membranaire est importante plus la densité de courant calcique est forte. De

plus, une étude de Funari et al. (2003) indique que l'OA a la faculté de modifier la courbure de la bicouche lipidique. Selon ces auteurs, cette modification structurale expliquerait en partie les modulations exercées par l'OA sur les protéines membranaires, comme par exemple les canaux ioniques.

Lors de notre étude, la différence de densité du courant entant calcique lent pourrait également être la conséquence d'une modification du nombre de canaux calciques présents dans la membrane cellulaire. Selon Clarke, (2001) et Duplus et al. (2000) les Ag ont la capacité de moduler la transcription de certains gènes. De tels effets sur la transcription des canaux calciques pourraient expliquer les modifications observées dans notre étude en fonction de la teneur en Ag de l'alimentation.

En conclusion, des modifications des propriétés biophysiques de la membrane cellulaire, par l'intégration des Ag dans la bicouche lipidique, pourraient être responsable de la modulation du courant calcique de type L. De la même manière que lors de la perfusion directe d'OA, la diminution du courant calcique induite par une forte teneur en OA et LA dans les membranes cellulaires aurait un rôle protecteur cardiaque en diminuant la fréquence d'apparition des arythmies induites par une surcharge calcique. Inversement, l'augmentation du courant calcique observée lorsque les membranes sont riches en EPA pourrait avoir des effets néfastes sur le fonctionnement cardiaque. Cet élévation pourrait favoriser les phénomènes arythmogéniques mais aussi les processus de nécrose ou d'apoptose générés dans les conditions d'une surcharge de calcium libre intracellulaire.

# *Conclusion générale*

## **Conclusion générale**

### **Bilan de l'étude**

L'approche expérimentale, réalisée à deux niveaux organisationnels grâce à l'utilisation de deux techniques expérimentales; le tunnel de nage et le patch clamp, contribue à une meilleure compréhension de l'effet des acides gras sur les performances cardiaques et respiratoires des poissons.

**Dans la première partie** de l'étude nous avons clairement montré que la composition en acides gras de l'alimentation influençait les profils lipidiques tissulaires des poissons. Ces variations sont associées à des modulations des performances cardio-respiratoires. En effet, les poissons nourris avec une alimentation enrichie en huile de colza (riche en OA et LA) possèdent de meilleures performances de nage que ceux nourris avec l'huile de foie de morue (riche en n-3 PUFA). De plus, dans cette étude il apparaît que le taux d'OA et LA du tissu cardiaque est significativement et positivement corrélé avec les performances maximales de nages, cardiaques et métaboliques des bars. Ces résultats confirment les observations préliminaires réalisées chez le saumon Atlantique. En effet, une relation linéaire positive a été mise en évidence entre les taux d'OA et de LA musculaires et la vitesse maximale de nage (McKenzie et al., 1998). Néanmoins, ces données sont en totale contradiction avec celles de Wagner et al. (2004) qui rapportent une corrélation négative.

L'épreuve d'hypoxie n'a révélé aucune action bénéfique des n-3 PUFA par rapport aux Acs saturés. Le test de nage réalisé trente minutes après cette épreuve montre que, quelles que soient leurs alimentations, les poissons semblent avoir récupérés rapidement des conditions hypoxiques.

**La deuxième partie** de notre travail a permis de mettre en évidence un effet aigu de l'OA sur les canaux calciques de type L. En effet, une perfusion d'OA non estérifié sur les cardiomyocytes ventriculaires du bar induit une diminution « dose-dépendante » de la conductance globale du courant calcique de type L sans modification des paramètres d'activation et d'inactivation du canal. Dans ce contexte, nous avons également démontré

qu'une modification de la composition en Ags de la membrane cellulaire pouvait induire les mêmes effets sur le courant entrant calcique, qu'une perfusion directe d'OA. Effectivement, les membranes enrichies en OA et LA (par apports alimentaires) possèdent une conductance calcique lente significativement inférieure à celles des myocytes ventriculaires ayant un taux élevé de EPA.

## **Mécanismes d'actions des acides gras**

Si de nombreuses études ont révélé des effets des acides gras sur différentes conductances ioniques, les mécanismes moléculaires impliqués restent toutefois mal connus. Différentes hypothèses ont été proposées:

Les propriétés physiques des membranes cellulaires dépendent de leur composition en Ags. Par exemple, la fluidité membranaire est influencée par la longueur de la chaîne carbonée et le nombre de doubles liaisons des Ags ainsi que la température environnementale. Plusieurs études ont montré qu'une modification de la fluidité membranaire modulait l'activité des protéines membranaires (Squier et al., 1988; Slater et al., 1994). Une diminution de fluidité membranaire va engendrer une baisse de l'activité de la pompe calcium-ATPase du reticulum sarcoplasmique (Squier et al., 1988). Dans notre étude, des changements de fluidité membranaire induits par les variations de la composition en Ags des membranes ou par l'application directe de l'OA pourraient être responsables des différences observées sur la conductance du canal calcique de type L. L'élasticité est une autre caractéristique essentielle de la membrane cellulaire qui dépend aussi de la composition de la bicouche lipidique (Rawics et al., 2000). Elle permet à la membrane d'adapter l'épaisseur de sa partie hydrophobe à la longueur de la partie hydrophobe d'une protéine transmembranaire (Lundbaek et Andersen, 1994). Le changement de conformation d'une « protéine canal » va s'accompagner d'une déformation de la bicouche lipidique environnante afin d'adapter son épaisseur à la modification de longueur de la protéine. Une variation des propriétés élastiques de la membrane va conduire à une modification de coût énergétique de cette déformation et va donc influencer sur la capacité du canal à changer de conformation (Lundbaek et al., 2004; Figure C1). Ceci peut se traduire par des modifications des propriétés biophysiques du canal. En effet, Lundbaek et al., (2004) ont montré que la perfusion de molécules lipophiles, connues pour modifier l'élasticité membranaire ( $\beta$ -octyl-glucoside, Genapole

X-100...), réduisait la conductance des canaux sodiques des muscles squelettiques. Ainsi, les effets inhibiteurs de l'OA sur la conductance des canaux calciques de types L pourrait s'expliquer par des mécanismes d'action similaires à ceux observés par Lundbeck et al., (2004). Par ailleurs, la composition en Acs des phospholipides peut également interagir sur la courbure de la membrane lipidique et modifier l'activité des protéines transmembranaires. Les travaux de Funari et al. (2003) ont révélé qu'une intégration d'OA dans la phosphatidyléthanolamine modulait la structure membranaire en induisant des contraintes de courbure membranaire négative (Figure C1). Selon cette étude, cette modification biomécanique explique les effets de l'acide oléique, observés par rapport à un acide gras saturé (acide myristique), sur l'augmentation de disponibilité de protéines membranaires comme les protéines G (Escriba et al., 1995). Dans notre étude, une variation de la courbure membranaire pourrait également être impliquée.

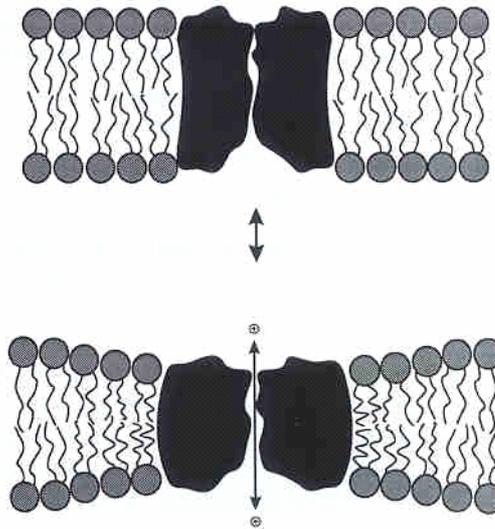
D'autres mécanismes d'action des Acs sont également possibles. Ils peuvent notamment modifier l'expression génétique de certaines protéines impliquées dans le transport et le métabolisme des Acs, ou dans le système immunitaire (Jenski, 2000; Clarke, 2001; Duplus et al., 2000). Des effets similaires sur l'expression des canaux ioniques pourraient expliquer les différences de conductances observées sur les myocytes ventriculaires.

Les acides gras sont des substrats importants pour le métabolisme aérobie des poissons (Hochachka and Somero, 1994; Watanabe, 1982). Lors de la  $\beta$ -oxydation, les acides gras mono-insaturés sont des substrats métaboliques préférentiellement utilisés par rapport aux acides gras saturés et poly-insaturés (Sidell and Driedzic, 1985; Henderson and Sargent, 1985; Egginton, 1996). Les propriétés biochimiques et énergétiques des acides gras mono-insaturés (comme l'OA) pourraient ainsi expliquer en partie les différences de performance observées lors de l'épreuve de nage

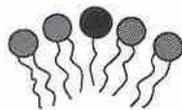
## **Rôle des acides gras**

Nos travaux ont mis en évidence une corrélation positive entre les teneurs ventriculaires en acides oléiques et linoléiques et les performances cardio-respiratoires des bars. D'après des études récentes, le débit cardiaque maximal des poissons pourrait limiter la consommation d'oxygène et les performances aérobies maximales des poissons (Farrell,

**Figure C1**



**A.** Couplage hydrophobique entre une protéine transmembranaire et la bicouche lipidique environnante. Les changements de conformation de la protéine sont accompagnés d'une déformation de la bicouche lipidique (Lundbaek et al., 2004).



**Courbure positive**



**Courbure négative**

**B.** Représentation schématique d'une courbure positive ou négative d'une couche phospholipidique (lundbaek et al., 2004).

2002; Claireaux et al., 2005). Selon cette hypothèse, la limitation des performances cardiaques serait directement reliée à la quantité d'oxygène disponible pour le cœur (Farrell, 2002). En effet, le cœur est irrigué par du sang veineux et ne possède pas ou peu de coronaires. De ce fait, lors d'un exercice soutenu, il y a une diminution du niveau d'oxygène du sang veineux alors que les besoins du cœur en oxygène augmentent. Dès lors, un apport insuffisant en oxygène au cours d'un effort soutenu aboutit à une hypoxie cardiaque. Le cœur ne peut alors plus assurer une irrigation suffisante de tous les organes et est ainsi responsable de la limitation des performances de nage.

Au cours d'une hypoxie, les carbohydrates deviennent les substrats métaboliques préférentiels de l'organisme (Van den Thillart et Van Raaij, 1995). Dans ces conditions, les NEFA ne seraient plus métabolisés. Une étude a montré que lors d'un exercice aérobique, le taux de NEFA circulant restait inchangé chez la truite arc-en-ciel (Bernard et al., 1999). Dans ces conditions, un apport inchangé des NEFA associé à une baisse de leur utilisation pour le métabolisme serait susceptible de favoriser leur accumulation cellulaire. Dans un même temps, la mauvaise oxygénation du tissu cardiaque va également conduire à une augmentation du calcium intracellulaire (Vornanen et Tuomennoro, 1999). Si cette augmentation est suffisante, l'hypercalcémie intracellulaire va induire des perturbations du fonctionnement cardiaque notamment par l'apparition d'arythmies. L'OA peut agir sur l'homéostasie calcique de plusieurs façons. Nous avons montré que l'OA non estérifié est capable de diminuer l'influx de calcium *via* les canaux calciques de type L. Ainsi, dans les conditions hypoxiques, l'accumulation cellulaire de NEFA et donc d'OA non estérifié va pouvoir potentialiser son effet inhibiteur sur  $I_{Ca,L}$  et diminuer l'entrée de calcium dans les myocytes. En outre, nos travaux ont révélé un  $I_{Ca,L}$  plus faible dans les membranes cardiomyocytaires riches en OA par rapport aux membranes riches en n-3 PUFA. De plus, chez le mammifère, l'OA a un effet inhibiteur sur les canaux sensibles à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique (Honen et al., 2003). Il en résulte une diminution de la libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique. L'ensemble de ces mécanismes induits par l'OA pourrait limiter l'occurrence de surcharges calciques et ainsi diminuer les risques d'apparitions d'arythmies cardiaques (Figure C2).

Au cours des expériences de nage, nous avons pu observer visuellement des arythmies cardiaques quelques minutes avant que les poissons n'arrêtent de nager. Les poissons nourris avec une alimentation riche en OA nageaient significativement plus vite avant de s'arrêter. En conséquence, chez ces poissons, les arythmies n'apparaissaient pas avant des débit cardiaques plus élevés que ceux des poissons ayant reçus moins d'OA. Ainsi, une

**Figure C2**

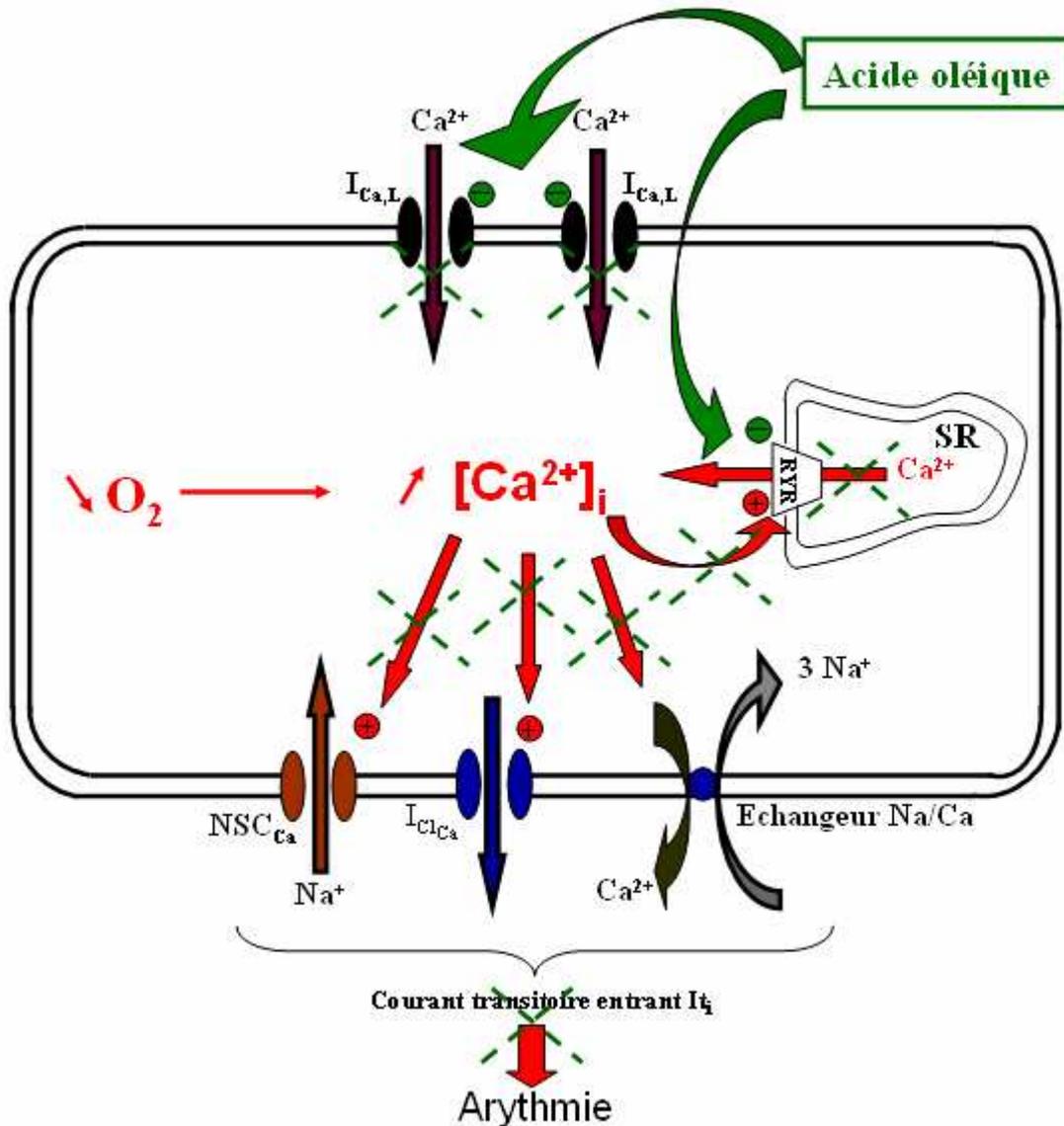


Schéma représentant les effets protecteurs de l'acide oléique contre les risques d'arythmies liés aux surcharges calciques. Les flèches rouges montrent les conséquences d'une surcharge calcique sur différents canaux ioniques. Les flèches vertes, les effets de l'acide oléique. Le signe + indique une activation, le signe - une inhibition. Les croix vertes indiquent le blocage des effets d'une surcharge calcique.  $NSC_{Ca}$ , canal cationique non sélectif activé par le calcium;  $I_{ClCa}$ , courant chlore activé par le calcium; RS, réticulum sarcoplasmique; RYR, récepteur à la ryanodine.

limitation précoce de l'apparition d'arythmies, par l'apport d'OA membranaire et circulant, pourrait expliquer les meilleures performances cardiaques des poissons. Notre étude en électrophysiologie a montré que les animaux nourris avec un taux élevé de n-3 PUFA présentaient un courant calcique entrant de type L cardiaque plus important que ceux nourris avec un taux élevé d'OA. Si une diminution de  $I_{Ca,L}$  peut s'avérer bénéfique dans les situations décrites précédemment, une élévation de ce courant pourrait se révéler avantageuse dans d'autre circonstance. En effet, au cours de nos expérimentations, tous les poissons étaient acclimatés à 20°C. Des expérimentations réalisées chez le bar montrent que la quantité de calcium libre cytoplasmique, mobilisé pendant une stimulation des myocytes ventriculaires, était dépendante de la température d'acclimatation des animaux. Au cours de ces expériences, la quantité de calcium mobilisée était supérieure pour les bars acclimatés à 20°C par rapport à des températures plus faibles de 10 et 15°C (Thèse de C. Mercier 2002). En outre, le courant calcique de type L est modulé par la température chez la truite arc-en-ciel. En effet, les truites acclimatées à 7°C ont un  $I_{Ca,L}$  plus faible que celles acclimatées à 21°C. Dans ces conditions, si l'OA peut s'avérer bénéfique à des températures élevées, une membrane riche en n-3 PUFA pourrait permettre de compenser les diminutions importantes de  $I_{Ca,L}$  observées à basses températures.

La température est un facteur important affectant l'activité des poïkilothermes comme les poissons dans leur environnement naturel. Les membranes cellulaires sont les premières cibles affectées par les changements de température et leurs compositions lipidiques répondent immédiatement à ces challenges. Une baisse de la température va engendrer une diminution de la fluidité membranaire. Afin de contrer cet effet, les poissons sont contraints de maintenir cette fluidité en augmentant la quantité d'Ags insaturés. En effet, les Ags insaturés s'accumulent dans les membranes lorsque les poissons sont soumis à de faibles températures (Williams et Hazel, 1992; Wallrecht et Babin, 1994). Inversement, une accumulation d'acides gras mono-insaturés et une diminution de n-3 PUFA a été mis en évidence chez des bars juvéniles acclimatés à 29°C par rapport à 22°C (Person-Le Ruyet et al., 2004). Ainsi, un apport plus important de n-3 PUFA serait nécessaire au maintien des propriétés physiques des membranes cellulaires lorsque la température diminue. Nous avons vu que le courant  $I_{Ca,L}$  était plus important dans les membranes riches en n-3 PUFA que celles riches en OA. Ceci permettrait de conserver un niveau de calcium suffisant pour assurer un bon fonctionnement cardiaque à faible température. A l'inverse, à des températures élevées, les n-3 PUFA auraient un effet négatif en favorisant des niveaux importants de calcium cellulaire. Dans ce cas, un taux

élevé d'OA en stabilisant la membrane diminuerait l'influx calcique. Ces mécanismes limiteraient les risques liés à l'augmentation de  $I_{Ca,L}$  induite par l'élévation de température. Au cours de leur vie, les bars sont confrontés à des variations de température et de disponibilité en Ags dans leur environnement naturel. Ainsi, une alimentation riche en n-3 PUFA serait nécessaire lorsque ces poissons se trouvent dans des eaux froides tandis qu'une alimentation riche en OA favoriserait leur survie en eau plus chaude.

Cette interaction offre des possibilités d'explication des nombreux résultats contradictoires qui concernent les effets physiologiques des Ags. En effet, les poissons étant des poïkilothermes, la température joue un rôle fondamental dans l'influence bénéfique ou négative que peuvent avoir certains acides gras sur les performances cardio-respiratoires des poissons. Dans la présente étude réalisée à 20°C, l'OA est associé aux performances natatoires optimales des bars. En revanche, Wagner et al., (2004) ont montré que ce même Ags était liés aux moins bonnes performances natatoires des saumons Atlantiques à des températures situées entre 10 et 12°C. Ces différences de températures d'expérimentation sont très intéressantes. En effet, la température de fusion (passage entre l'état solide et liquide) de l'OA se situe aux alentours de 13°C. En conséquence, la membrane est plus fluide lorsque la température est supérieure à 13°C. Ainsi, les différences de fluidité membranaire pourraient expliquer les divergences de résultats entre ces deux études.

## **Perspectives**

Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de clarifier les effets spécifiques des Ags. Il serait notamment intéressant de réaliser une étude en électrophysiologie sur l'effet d'autres acides gras comme l'EPA, le DHA et le LA. Ceci permettrait de vérifier les effets inhibiteurs, préalablement observés chez le mammifère, de l'EPA et du DHA sur le courant calcique de type L (Xiao et al., 1997). Parallèlement, il est fondamental d'analyser, par la technique de cytofluorimétrie calcique, les modalités d'action des Ags sur la dynamique des variations de calcium intracellulaire dans les myocytes cardiaques de bars. Ces expériences permettraient de vérifier les effets des Ags sur les récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique.

En outre, il serait également important d'étudier les effets des Ags non estérifiés et des Ags membranaires sur les propriétés physiques des membranes cellulaires. Ceci pourrait être réalisé par l'utilisation de sondes lipidiques fluorescentes permettant d'observer le déplacement latéral des lipides dans les membranes et/ou par la technique de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN).

L'évaluation du taux de NEFA circulants chez le bar lors d'une épreuve de nage et d'une épreuve d'hypoxie serait également indispensable.

L'hypothèse selon laquelle la température jouerait un rôle déterminant dans les effets observés des Ags pourrait également être testée. En effet, des expériences similaires à celles utilisées dans notre étude sur des poissons acclimatés à différentes températures pourraient être envisagées.

# *Bibliographie*

## **Bibliographie**

### **A-B-C**

**Abraham, N.G., Pinio, A., Levere, R.D., et Mullane, K.** (1987). Identification of hemo oxygenase and cytochrome P-450 in the rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **19**: 73-81.

**Agnisola, C., McKenzie, D.J., Taylor, E.W., Bolis, C.L., et Tota, B.** (1996). Cardiac performance in relation to oxygen supply varies with dietary lipid composition in sturgeon. *Am. J. Physiol.* **271**: 417-425.

**Aho, E., et Vornanen, M.** (1999). Comparison of contractile properties of atrial and ventricular tissue of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart: effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* **201**: 2663-2677.

**Aida, K., Phan, N.V., et Hibiya, T.** (1973). Physiological studies on gonadal maturation of fishes. I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **39**: 1091-1106.

**Al Makdessi, S., Brandle, M., Ehrt, M., Sweidan, H. et Jacob, R.** (1995). Myocardial protection by ischemic preconditioning: the influence of the composition of myocardial phospholipids. *Mol. Cell. Biochem.* **145**: 69-73.

**Allbritton, N.L., Oancea, E., Kuhn, M.A., et Meyer, T.** (1994). Source of nuclear calcium signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12458-12462.

**Anderson, M.E.** (2000). Connection count. Excitation-contraction meets excitation-transcription coupling. *Circ. Res.* **86**: 717-719.

**Argibay, J.A., Fishmeister, R., et Hartzell, H.C.** (1988). Inactivation, reactivation and pacing dependence of calcium current in frog cardiomyocytes: correlation with current density. *J. Physiol.* **401**: 201-226.

**Axelsson, M. and Farrell, A.P.** (1993). Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **264**: 963-971.

**Axelsson, M., Altimiras, J., and Claireaux, G.** (2002). Post-prandial blood flow to the gastrointestinal tract is not compromised during hypoxia in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. exp. Biol.* **205**: 2891-2896.

**Axelsson, M., Davison, W., Forster, M.E., et Farrell, A.P.** (1992). Cardiovascular-responses of the red-blooded Antarctic fishes *Pagothenia bernacchii* and *P. borchgrevinki*. *J. Exp. Biol.* **167**: 179-201.

**Balke, C.W., Rose, W.C., Marban, E., et Wier, W.G.** (1992). Macroscopic and unitary properties of physiological ion flux through T-type Ca<sup>2+</sup> channels in guinea-pig heart cells. *J. Physiol.* **456**: 247-265.

**Ballantyne, J.S., Mercure, F., Gerrits, M.F., Van Der Kraak, G., McKinley, S., Martins, D.W., Hinch, S.G. et Diewert, R.E.** (1996). Plasma nonesterified fatty acid

profiles in male and female sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, during the spawning migration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 1418-1426

**Beamish, F.W.H.** (1978). Swimming capacity. In: *Fish Physiology*, vol. VII (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 101–187. New York: Academic Press.

**Bean, B.P.** (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 367-384.

**Bell, J.G., McEvoy, L., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., et Sargent, J.R.** (2001). Replacement of fish oil with Rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* **131**: 1535-1543.

**Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., et Sargent, J.R.** (2002). Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J. Nutr.* **132**: 222-230.

**Bendahhou, S., Cummins, T.R., et Agnew, W.S.** (1997). Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **272**: C592-C600.

**Benediktsdottir, V.E., Curvers, J. et Gudbjarnason, S.** (1999). Time course of alterations in phospholipids fatty acids and number of  $\beta$ -adrenoceptors in the rat heart during adrenergic stimulation *in vivo*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**: 1105-1115.

**Benndorf, K., Boldt, W., et Nilius, B.** (1985). Sodium current in single myocardial mouse cells. *Pflügers. Arch.* **404**: 190-196.

**Bernard, S.F., Reidy, S.P., Zwingelstein, G. et Weber, J.-M.** (1999). Glycerol and fatty acid kinetics in rainbow trout: effects of endurance swimming. *J. Exp. Biol.* **202**: 279-288.

**Bers, D.M.** (1987). Ryanodine and the calcium content of the SR assessed by caffeine and rapid cooling contractures. *Am. J. Physiol.* **253**: 408-415.

**Bers, D.M.** (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**: 198-205.

**Bogdanov, K.Y., Spurgeon, H.A., Vinogradova, T.M., et Lakatta, E.G.** (1998). Modulation of the transient outward current in adult rat ventricular myocytes by polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **274**: H571-H579.

**Bois, P., et Lenfant, J.** (1991). Evidence for two types of calcium currents in frog cardiac sinus venosus cells. *Pflügers Arch.* **417**: 591-596.

**Brett, J.R.** (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **21**: 1183-1226.

**Brill, R.W., et Bushnell, P.G.** (2001). The cardiovascular system of tunas. In: *Tuna: physiology, ecology and evolution* (ed. B.A. Block, E.D. Stevens), pp 79–120. Academic, San Diego.

- Canelle, E.D., Campbell, G.S., Smolish, J., et Campbell, J.H.** (1986). Cardiac muscle. Springer Verlag. Berlin.
- Carafoli, E.** (1992). The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **267**(4): 2115-2118.
- Carmeliet, E.** (1999). Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol. Rev.* **79**(3): 917-1017.
- Cavalié, A., Ochi, R., Pelzer, D., et Trautwein, W.** (1983). Elementary current through Ca<sup>2+</sup> channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* **398**: 284-297.
- Charnock, J.S.** (1991). Antiarrhythmic effects of fish oils. In: Health effects of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. (ed. A.P. Simopoulos, R.R. Kifer, R.E. Martin and S.M. Barlow), pp. 66: 278-291, Karger, Basel.
- Charnock, J.S., Abeywardena, M.Y., et McLennan, P.L.** (1986). Comparative changes in the fatty acid composition of rat cardiac phospholipids after long-term feeding of sunflower seed oil- or tuna fish oil-supplemented diets. *Ann. Nutr. Metab.* **30**: 393-406.
- Charnock, J.S., Abeywardena, M.Y., Poletti, V.M., et McLennan, P.L.** (1992). Differences in fatty acid composition of various tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) after lipid supplemented diets. *Comp. Biochem. Physiol.* **101**(A): 387-393.
- Charnock, J.S., Dryden, W.F., McMurchie, E.J., Abeywardena, M.Y., et Russel, G.R.** (1984). Difference in the fatty acid composition of atrial and ventricular phospholipids in rats fed different lipid supplements. *Lipids* **19**: 206-213.
- Chatelier, A., McKenzie, D.J., et Claireaux, G.** (2005). Effects of changes in water salinity upon exercise and cardiac performance in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biol.* **147**: 855-862.
- Christie, W.W.** (1984). Extraction and hydrolysis of lipids and some reactions of their fatty acid components. In: Handbook of Chromatography, Lipids, Vol.1 (ed. G. Zweig and J. Sherma), pp. 33-46, Boca Raton, CA: CRC Press Inc.
- Claireaux, G., McKenzie, D.J., Genge, A.G., Chatelier, A., Aubin, J., et Farrell, A.P.** (2005). Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **208**: 1775-1784.
- Clark, T.D., Ryan, T., Ingram, B.A., Woakes, A.J., Butler, P.J. et Frappell, P.B.** (2005). Factorial aerobic scope is independent of temperature and primarily modulated by heart rate in exercising murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Physiol. Biochem. Zool.* **78**(3): 347-355.
- Clarke, S.D.** (2001). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.* **131**: 1129-1132.
- Coraboeuf, E., et Carmeliet, E.** (1982). Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch.* **392**: 352-359.

**Coraboeuf, E., et Weidman, S.** (1954). Temperature effects on the electrical activity of purkinje fibres. *Helvetica Physiologica Acta* **12**: 32-41.

**Cordier, M., Brichon, G., Weber, J.M., et Zwingelstein, G.** (2002). Changes in the fatty acid composition of phospholipids in tissues of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during an annual cycle. Roles of environmental temperature and salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* **133(B)**: 281-288.

**Coyne, M.D., Kim C.S., Cameron J.S. et Gwathmey J.K.** (2000). Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**: 1535-1544.

**Crumb, W.J., Munfakh, N., Heck, H.A., et Harrison, L.H.** (1999). Fatty acid block of the transient outward current in adult human atrium. *J. Pharmacol. Exp. Pharma.* **289**: 386-391.

### *D-E-F*

**Davie, P.S. et Farrell, A.P.** (1991). The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes. *Can. J. Zool.* **69**: 1993-2001.

**Day, N. and Butler, P.J.** (1996). Environmental acidity and white muscle recruitment during swimming in the brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.* **199**: 1947-59.

**Dejours, P., Garey, W.F. et Rahn, H.** (1970). Comparison of ventilatory and circulatory flow rates between animals in various physiological conditions. *Respir. Physiol.* **9(2)**: 108-117.

**Delcher, H., Fried, M., et Shipp, J.C.** (1965). Metabolism of lipoprotein lipid in the isolated perfused rat heart. *Biochim. Biophys. Acta.* **106**: 10-18.

**Dolphin, P.J.** (1985). Lipoprotein metabolism and the role of apolipoproteins as metabolic programmers. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**: 850-869.

**Driedzic, W.R. et Gesser, H.** (1988). Differences in force-frequency relationships and calcium dependency between elasmobranch and teleost hearts. *J. Exp. Biol.* **140**: 227-241.

**Duchen, M.R.** (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J. Physiol.* **529.1**: 57-69.

**Duplus, E., Glorian, M. et Forest, C.** (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* **275(40)**: 30749-30752.

**Egginton, S.** (1996). Effect of temperature on optimal substrate for  $\beta$ -oxidation. *J. Fish. Biol.* **49**: 753-758.

**Ehringer, W., Belcher, D., Wassal, S.R. et Stillwell, W.**(1990). A comparison of the effects of linolenic (18:3 $\Omega$ 3) and docosahexaenoic (22:6 $\Omega$ 3) acids on phospholipids bilayers. *Chem. Phys. Lipids* **54**: 79-88.

- Eisner, D.A., et Smith, T.W.** (1992). The Na-K pump and its effectors in cardiac muscle. In: *The heart and cardiovascular system.* (ed. Fozzard, H.A., Haber, E., Jennings, R.B., Katz, A.M., et Morgan, H.E.) **35**: 983-902.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P. et Tanabe, T.** (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**: 533-535.
- Escribá, P.B., Sastre, M. et García-Sevilla, J.A.** (1995). Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7595-7599.
- Farkas, T.** (1967). Examinations of fat metabolism in freshwater fishes. The sympathetic nervous system and mobilisation of fatty acids. *Ann. Inst. Biol. Hung. Acad. Sci.* **34**: 129-138.
- Farrell, A.P.** (1984). A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation. *Can. J. Zool.* **62**: 523-536.
- Farrell, A.P.** (1993). Cardiovascular system. In: *The physiology of fishes* (ed. D.H. Evans,), pp. 219-250. CRC press, Boca Raton.
- Farrell, A.P.** (1996). Features heightening cardiovascular performance in fishes, with special reference to tunas. *Comp. Biochem. Physiol.* **113 A**: 61-67.
- Farrell, A.P.** (1997) Effects of temperature on cardiovascular performance. In: *Global warming: implications for freshwater and marine fish* (ed. C.M. Wood and D.G. McDonald), pp. 135-158. Cambridge: Cambridge University Press.
- Farrell, A.P.** (2002) Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **132(A)**: 797-810.
- Farrell, A.P. et Jones, D.R.** (1992). The heart. In: *Fish Physiology: The cardiovascular system*, Vol. XII. (ed. W.S Hoar, D.J Randall, A.P Farrell) pp.1-88. Academic Press, New York.
- Farrell, A.P., MacLeod, K.R., et Chancey, B.** (1986). Intrinsic mechanical properties of the perfused rainbow trout heart and the effects of catecholamines and extracellular calcium under control and acidotic conditions. *J. Exp. Biol.* **125**: 319-345.
- Farrell, A.P., Wood, S., Hart, T. and Driedzic, W.R.** (1985). Myocardial oxygen consumption in the sea raven, *Hemitripterus americanus*. The effect of volume loading, pressure loading and progressive hypoxia. *J. Exp. Biol.* **117**: 237-250.
- Ferrier, G.R., Redondo, I., Zhu, J. et Murphy, M.G.** (2002). Differential effects of docosahexaenoic acid on contractions and L-type Ca<sup>2+</sup> current in adult cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **54**: 601-610.
- Fiolet, J.W.T., et Baartscheer, A.** (2000). Cellular calcium homeostasis during ischemia; a thermodynamic approach. *Cardiol. Res.* **45**:100-206.

**Fischmeister, R. et Horackova, M.** (1983). Variation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  following  $\text{Ca}^{2+}$  current in heart. A theoretical study of ionic diffusion inside a cylindrical cell. *Biophys. J.* **41**: 341-348.

**Fishmeister, R. et Hartzell, H.C.** (1986). Mechanisms of action of acetylcholine on calcium current on single cells from frog ventricle. *J. Physiol.* **376**: 183-202.

**Folch, J., Lees, M. et Sloane Stanley, G.H.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.

**Frederickson, D.S., et Gordon, R.S.** (1958). Transport of fatty acids. *Physiol. Rev.* **38**: 585-630.

**Fry, F.E.J.** (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. In: *Fish physiology* (ed. W.S. Hoar & D.J. Randall), pp. 1–98. London: Academic Press.

**Funari, S.S., Barcelo, F. et Escriba, P.V.** (2003). Effects of oleic acid and its congeners, olaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. *J. Lipid Res.* **44**: 567-575.

### *G-H-I*

**Gallaugh, P.E., Thorarensen, H., Kiessling, A., et Farrell, A.P.** (2001). Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transfer and osmotic balance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. *J. Exp. Biol.* **204**: 2861–2872.

**Galois, R., Richard, P. et Fricourt, B.** (1996). Seasonal variations in suspended particulate matter in the Marennes-Oleron Bay, France, using lipids as biomarkers. *Estuarine-coastal-and-shelf-science* **43(3)**: 335-357.

**Gamperl, A.K., Axelsson, M. and Farrell, A.P.** (1995). Effects of swimming and environmental hypoxia on coronary blood flow in rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **269**: 1258-1266.

**Ganim, R., Peckol, E., Larkin, G., Ruchhoeft, M., et Cameron, J.** (1998). ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in cardiac muscle from cold-acclimated goldfish: characterisation and altered response to ATP. *Comp. Biochem. Physiol.* **119A**: 395-401.

**Giles, W., et Imaizumi, Y.** (1988). Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J. Physiol.* **405**: 123-145.

**Gillis, T.E., Marshall, C.R., Xue, X-H., Bogford, T.J., et Tibbits, G.F.** (2000).  $\text{Ca}^{2+}$  binding to cardiac troponin C: effects of temperature and pH on mammalian and salmonid isoforms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**: 1707-1715.

**Goldin, A.L.** (2002). Evolution of voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels. *J. Exp. Biol.* **205**: 575-584.

**Gregorio, C.C., et Fowler, V.M.** (1996). Tropomodulin function and thin filament assembly in cardiac myocytes. *Trends Cardiovasc. Med.* **6**: 136-141.

- Grynberg, A., Fournier, A., Sergiel, J.P. et Athias, P.** (1995). Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the phospholipids of rat heart muscle cells on adrenoceptor responsiveness and mechanism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 2507-2520.
- Guinamard, R., Chatelier, A., Demion, M., Potreau, D., Patri, S., Rahmati, M., and Bois, P.** (2004a). Functional characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated non-selective cation channel in human atrial cardiomyocytes. *J. Physiol.* **558**(1): 75-83.
- Guinamard, R., Chatelier, A., Lenfant, J., and Bois, P.** (2004b). Activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated nonselective cation channel by diacylglycerol analogues in rat cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **15**: 342-348.
- Hadley, R.W., et Hume, J.R.** (1987). An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels ion guinea-pig myocytes. *J. Physiol.* **389**: 205-222.
- Hagiwara, N., Irisawa, H. et Kameyama, M.** (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* **395**: 233-253.
- Hajnoczky, G., Davies, E et Madesh, M.** (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res.* **304**: 445-454.
- Hallaq, H., Smith, T.W. et Leaf, A.** (1992). Modulation of dihydropyridines-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1760-1764.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., et Sigworth, F.J.** (1981). Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers. Arch.* **391**: 85-100.
- Harris, P., Gloster, J.A., et Ward, B.J.** (1980). Transport of fatty acids in the heart. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **73**: 593-598.
- Haverinen, J., et Vornanen, M.** (2004). Temperature acclimation modifies  $\text{Na}^+$  current in fish cardiac myocytes. *J. Exp. Biol.* **207**: 2823-2833.
- Heath, A.G. et Hughes, G.M.** (1973). Cardiovascular and respiratory changes during heat stress in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* **59**: 323-338.
- Heinemann, S.H., Schlieff, T., Mori, Y., et Imoto, K.** (1994). Molecular pore structure of voltage-gated sodium and calcium channels. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**: 2781-2802.
- Henderson, R.J. et Sargent, J.R.** (1985). Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **82**(B): 79-85.
- Hirano, Y., Fozzard H.A. et January, C.T.** (1989). Characteristics of L- and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in canine cardiac purkinje cells. *Am. J. Physiol.* **256**: H1478-H1492.
- Hochachka, P.W. et Somero, G.N.** (1984). *Biochemical Adaptation*. Princeton: Princeton University Press.

- Hodgkin, A.L., et Huxley, A.F.** (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**: 500-544.
- Honen, B.N., Saint, D.A., et Laver, D.R.** (2003). Suppression of cardiac sparks in rat ventricular myocytes and direct inhibition of sheep cardiac RyR channels by EPA, DHA, and Oleic acid. *J. Membrane Biol.* **196**: 95-103.
- Honore, E., Barhanin, J., Attali, B., Lesage, F., et Lazdunski, M.** (1994). External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1937-1944.
- Hosey, M.M., Chien, A.J., et Purit, T.S.** (1996). Structure and regulation of L-type calcium channels. A current assessment of the properties and roles of channel subunits. *T. C. M.* **6**: 265-273.
- Huang, J.M-C., Xian, H., et Bacaner, M.** (1992). Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6452-6456.
- Hulbert, A.J. et Else, P.L.** (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J. Theor. Biol.* **199**: 257-274.
- Hulbert, A.J., Turner, N., Storlien, N.L.H. et Else, P.L.** (2005). Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol. Rev.* **80**: 155–169.
- Hume, J.R., et Uehara, A.** (1985). Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J. Physiol.* **368**: 525-544.
- Huxley, H.E.** (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**: 1356-1366.
- Isenberg, G.** (1977). Cardiac purkinje fibers. The slow inward current component under the influence of modified [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Pflügers Arch.* **371**: 61-69.

### ***J-K-L***

- Jain, K.E., Birtwell, I.K. et Farrell, A.P.** (1998). Repeat swimming performance of mature sockeye salmon following a brief recovery period: a proposed measure of fish health and water quality. *Can. J. Zool.* **76**: 1488-1496.
- Jenski, L.J.** (2000). Omega-3 fatty acids and the expression of membrane proteins: emphasis on molecules of immunologic importance. *Current organic chemistry* **4**: 1185-1200.
- Jones, D.R. et Randall, D.J.** (1978). The respiratory and circulatory systems during exercise. In: *Fish Physiology*, vol. VII (ed. W.S. Hoar and D.J. Randall), pp. 425–501. New York: Academic Press.
- Josephson, I.R., Sanchez-Chapula, J., et Brown, A.M.** (1984). A comparison of calcium currents in rat and guinea-pig single ventricular cells. *Circ. Res.* **54**: 144-156.

- Kang, J.X., Xiao, Y.F., et Leaf, A.** (1995). Free, long chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3997-4001.
- Kass, R.S., et Sanguinetti, M.C.** (1984). Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage and calcium mediated mechanisms. *J. Gen. Physiol.* **84**: 705-726.
- Kass, R.S., Lederer, W.J., Tsien, R.W., et Weingart, R.** (1978a). Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontraction induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol.* **281**: 187-208.
- Kass, R.S., Tsien, R.W., et Weingart, R.** (1978b). Ionic basis of transient inward current induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol.* **281**: 209-226.
- Katz, A.M.** (1992). Contractile proteins. In: *Physiology of the heart*. New York. 151-177.
- Katz, A.M.** (1997). Molecular biology of calcium channels in the cardiovascular system. *Am. J. Cardiol.* **80(9A)**: 171-221.
- Kiceniuk, J.W., et Jones, D.R.** (1977). The oxygen transport system in trout (*Salmo gairdneri*) during sustained exercise. *J. Exp. Biol.* **69**: 247-260.
- Kim, C.S., Coyne, M.D., et Gwathmey, J.K.** (2000). Voltage-dependant calcium channels in ventricular cells of rainbow trout: effect of temperature changes in vitro. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **278**: 1524-1534.
- Kolok, A.S.** (1999). Inter-individual variation in the prolonged locomotor performance of ectothermic vertebrates: a comparison of fish and herpetofaunal methodologies and a brief review of the recent fish literature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56**: 700-710.
- Kolok, A.S. et Farrell, A.P.** (1994a). Individual variation in the swimming performance and cardiac performance of northern squawfish, *Ptychocheilus oregonensis*. *Physiol Zool* **67**: 706-722.
- Kolok, A.S. et Farrell, A.P.** (1994b). The relationship between maximum cardiac output and swimming performance in northern squawfish, *Ptychocheilus oregonensis*: the effect of coronary artery ligation. *Can. J. Zool.* **72**: 1687-1690.
- Laflamme, M.A., et Becker, P.L.** (1996). Ca<sup>2+</sup>-induced current oscillations in rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* **78**: 707-716.
- Layden, J.D., Malkova, D. et Nimmo, M.A.** (2004). During exercise in the cold increased availability of plasma nonesterified fatty acids does not affect the pattern of substrate oxidation. *Metabolism* **53(2)**, 203-208.
- Lazdunski, M., Frelin, C., et Vigne, P.** (1985). The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentration of sodium and internal pH. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **17**: 1029-1042.

- Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y-F., Billman, G.E. et Voskuyl, R.A.** (1999). The antiarrhythmic and anticonvulsant effects of dietary N-3 fatty acids. *J. Membrane. Biol.* **172**: 1-11.
- Leaf, A., Xiao, Y-F., Kang, J.X., et Billman, G.E.** (2003). Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacology & Therapeutics* **98**: 355-377.
- Lee, K.S., Marban, E., et Tsien, R.W.** (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* **364**: 395-411.
- Lefrançois, C., Claireaux, G. et Lagardère, J-P.** (1998). Heart rate telemetry to study environmental influences on fish metabolic expenditure. *Hydrobiologia* **371/372**: 215-224.
- Leifert, W.R., McMurchie, E.J., et Saint, D.A.** (1999). Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Physiol.* **520.3**: 671-679.
- Liu, L., Barrett, C.F. et Rittenhouse, A.R.** (2001). Arachidonic acid both inhibits and enhances whole cell calcium currents in rat sympathetic neurons. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **280**: 1293-1305.
- Lundbaek, J.A. et Andersen, O.S.** (1999). Spring constants for channel-induced lipid bilayer deformations estimates using gramicidin channels. *Biophys. J.* **76**: 889-895.
- Lundbaek, J.A. et Anderson, O.S.** (1994). Lisophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* **104**: 645-673.
- Lundbaek, J.A., Birn, P., Hansen, A.J., Sogaard, R., Nielsen, C., Girshman, J., Bruno, M.J., Tape, S.E., Egebjerg, J., Greathouse, D.V., Mattice, G.L., Koeppe II, R.E. et Andersen, O.S.** (2004). Regulation of sodium channel function by bilayer elasticity: the importance of hydrophobic coupling. Effects of micelle-forming amphiphiles and cholesterol. *J. Gen. Physiol.* **123**: 599-621.

### *M-N-O*

- MacCormack, T.J., et Driedzic, W.R.** (2002). Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels influence force development and anoxic contractility in a flatfish, yellowtail flounder *Limanda ferruginea*, but not Atlantic cod *Gadus morhua* heart. *J. Exp. Biol.* **205**: 1411-1418.
- Mackay, K. et Mochly-Rosen, D.** (2001). Arachidonic acid protects neonatal cardiac myocytes from ischemic injury through  $\epsilon$  protein kinase C. *Cardiovasc. Res.* **50**: 65-74.
- Marban, E., Yamagishi, T. et Tomaselli, G.F.** (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* **508(3)**: 647-657.
- Martinez, M., Guderley, H., Nelson, J.A., Webber, D. et Dutil, J-D.** (2002). Once a fast cod, always a fast cod: Maintenance of performance hierarchies despite changing food availability in cod (*Gadus morhua*). *Physiol. Biochem. Zool.* **75(1)**: 90-100.

**Mazeaud, F.** (1973). Recherches sur la régulation des acides gras libres plasmatiques et de la glycémie chez les poissons. Thèse, Paris.

**McKenzie, D.J.** (2001). Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **128(A)**: 607-621.

**McKenzie, D.J.** (2005). Effects of dietary fatty acids on the physiology of environmental adaptation in fish. In: *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates* (ed. J.M. Starcke and T. Wang), pp. 363-388. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.

**McKenzie, D.J., Cataldi, E., Owen, S., Taylor, E.W. et Bronzi, P.** (2001). Effects of acclimation to brackish water on the growth, respiratory metabolism and exercise performance of Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **58**: 1104-1112.

**McKenzie, D.J., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Deacon, G. et Randall, D.J.** (1998). Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Fish Physiol. Biochem.* **19**: 111-122.

**McKenzie, D.J., Martinez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E.W., Steffensen, J.F. et Estrada, M.P.** (2003b). Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J. Fish Biol.* **63**, 398-409

**McKenzie, D.J., Piraccini, G., Papini, N., Galli, C., Bronzi, P., Bolis, C.G., et Taylor, E.W.** (1997). Oxygen consumption and ventilatory reflex responses are influenced by dietary lipids in sturgeon. *Fish. Physiol. Biochem.* **16**: 365-379.

**McKenzie, D.J., Piraccini, G., Piccolella, M., Steffensen, J.F., Bolis, C.L. et Taylor, E.W.** (2000). Effects of dietary fatty acid composition on metabolic rate and responses to hypoxia in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol. Biochem.* **22**: 281-296.

**McKenzie, D.J., Piraccini, G., Steffensen, J.F., Bolis, C.L., Bronzi, P. et Taylor, E.W.** (1995). Effects of diet on spontaneous locomotor activity and oxygen consumption in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Fish Physiol. Biochem.* **14**: 341-355.

**McKenzie, D.J., Shingles, A. et Taylor, E.W.** (2003a). Sub-lethal plasma ammonia accumulation and the swimming performance of salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* **135(A)**, 515-526

**Mercier, C.** (2002). Effet de la température, à différents niveaux organisationnels, sur le fonctionnement du myocarde. Repercussions sur les performances adaptatives des poissons: le bar européen *Dicentrarchus labrax*, la sole commune *Solea solea*, et la truite fario *Salmo trutta*. Thèse, la Rochelle.

**Michelsen, K.G., Harmon, J.S., et Sheridan, M.A.** (1994). Adipose tissue lipolysis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, is modulated by phosphorylation of triacylglycerol lipase. *Comp. Biochem. Physiol.* **107(B)**: 509-513.

- Mitchell, M.R., Powell, T., Terrar, D.A., et Twist, V.W.** (1983). Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proc. R. Soc.Lond [Biol]* **219**: 447-469.
- Mitcheson, J.S., et Sanguinetti, M.C.** (1999). Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol. Biochem.* **9**: 201-216.
- Morad, M., Goldman, Y.E. et Trentham, D.R.** (1981). Rapid photochemical inactivation of Ca<sup>2+</sup> antagonist shows that Ca<sup>2+</sup> entry directly activates contraction in frog heart. *Nature* **304**: 635-638.
- Mori, Y., Mikala, G., Varadi, G., Kobayashi, T., Koch, S., Wakamori, M., et Schwartz, A.** (1996). Molecular pharmacology of voltage dependant calcium channels. *Jpn. J. Pharmacol.* **72**: 83-109.
- Mougiou, V., Kouidi, E., Kyparos, A. et Deligiannis, A.** (1998). Effect of exercise on the proportion of unsaturated fatty acids in serum of untrained middle aged individuals. *Br. F. Sports Med.* **32**: 58-62.
- Nair, S.S.D.; Leitch, J.W., Falconer, J. et Garg, M.L.** (1997). Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J. Nutr.* **127**: 383-393.
- Negretti, N., Perez, M.R., Walker, D., et O'Neill, S.C.** (2000). Inhibition of sarcoplasmic reticulum function by polyunsaturated fatty acids in intact, isolated myocytes from rat ventricular muscle. *J. Physiol.* **523(2)**: 367-375.
- Neher, E. et Sakmann, B.** (1976). Single channel currents recording from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**: 799-802.
- Nelson, J.A., Gotwalt, P.A., Reidy, S.P. et Webber, D.M.** (2002). Beyond U<sub>crit</sub>: matching swimming performance tests to the physiological ecology of the animal, including a new 'drag strip'. *Comp. Biochem. Physiol.* **133**: 289-302.
- Neslon, J.A. et Claireaux, G.** (2005). Interindividual variance of sprint performance, swimming metabolism and endurance in a cohort of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Trans. Am. Fish. Soc.* (sous presse).
- Nielsen, C. et Andersen, O.A.** (2000). Inclusion-induced bilayer deformations: Effects of monolayer equilibrium curvature. *Biophys. J.* **79**: 2583-2604.
- Normann, P.T., Norseth, J., et Flatmark, T.** (1983). Acyl-CoA synthetase activity of rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **752**: 474-481.
- Nurmi, A., et Vornanen, M.** (2002). Electrophysiological properties of rainbow trout cardiac myocytes in serum-free primary culture. *Am. J. Physiol. Integrative Comp. Physiol.* **282**: 1200-1209.

***P-Q-R***

- Paajanen, V., et Vornanen, M.** (2002). The induction of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in cardiac myocytes of air- and water-breathing vertebrates. *Pflügers Arch.* **444**: 760-770.
- Paige, J.A., Liao, R., Hajjar, R.J., Foisy, R.L., Cory, C.R., O'Brien, P.J., et Gwathmey, J.K.** (1996). Effect of high omega-3 fatty acid diet on cardiac contractile performance in *Oncorhynchus mykiss*. *Cardiovasc. Res.* **31**: 249-262.
- Parrish, C.C. et Ackman, R.G.** (1985). Calibration of the Iatroscan-Chromarod system for marine lipid class analyses. *Lipids* **20**: 521-530.
- Patel, S.B., et Verma, S.C.** (1981). Cardiotonic activity of selective fatty acids in amphibian heart. *Ind. J. Pharmac.* **13(3)**: 271-277.
- Pepe, S. et McLennan, P.L.** (2002). Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation* **105(19)**: 2303-2308.
- Pepe, S., Bogdanov, K., Hallaq, H., Spurgeon, H. et Leaf, A.** (1994).  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type Ca<sup>2+</sup> channels, cytosolic Ca<sup>2+</sup>, and contraction in adult rat cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8832-8836.
- Person-Le Ruyet, J., Skalli, A., Dulau, B., Le Bayon, N., Le Delliou, H. et Robin, J.H.** (2004). Does dietary n-3 highly unsaturated fatty acids level influence the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) capacity to adapt to high temperature? *Aquaculture* **242**: 571-588.
- Pickett, G.D. et Pawson, M. G.** (1994) Sea bass. Biology, exploitation and conservation. In: *Fish and Fisheries series*, 12 (ed. Chapman and Hall), pp. 337. London.
- Pietrobon, D., Di Virgilio, F. et Pozzan, T.** (1990). Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **193**: 599-622.
- Piper, H.M., Noll, T., et Siegmund, B.** (1994). Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc. Res.* **28**: 1-15.
- Plaut, I.** (2001). Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp. Biochem. Physiol.* **131**: 41-50.
- Plisetskaya, E.** (1980). Fatty acid levels in the blood of cyclostomes and fish. *Environ. Biol. Fish.* **5**: 273-290.
- Ramp, D., et Kane, J.M.** (1994). Activators of voltage-dependant L-type calcium channel. *Drug Dev.* **33**: 344-363.
- Randall, D.J., McKenzie, D.J., Abrami, G., Bondiolotti, G.P., Natiello, F., Bronzi, P., Bolis, L. et Agradi, E.** (1992). Effects of diet on response to hypoxia in sturgeon (*Acipenser naccarii*). *J. Exp. Biol.* **170**: 113-125.

**Rawics, W., Olbrich, K.C., McIntosh, T., Needham, D. et Evans, E.** (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**: 328-339.

**Reid, S.G., Bernier, N.J., et Perry, S.F.** (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. part C.* **120**: 1-27.

**Reuter, H., Stevens, C.F., Tsien, R.W., et Yellen, G.** (1982). Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature* **297**: 501-504.

**Richards, R.G., Mercado, A.J., Clayton, C.A., Heigenhauser, G.J.F. et Wood, C.M.** (2002). Substrate utilisation during graded aerobic exercise in rainbow trout. *J. exp. Biol.* **205**: 2067-2077.

### *S-T-U*

**Santer, R.M.** (1985). *Morphology and Innervation of the Fish Heart*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-102.

**Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. et Estevez, A.** (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* **177**: 191-199.

**Sargent, J.R. et Tacon, A.G.J.** (1999). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* **58**: 377-383.

**Satchell, G.H.** (1991). *Physiology and form of fish circulation*. Cambridge university press.

**Sergiel, J.-P., Martine, L., Raederstorff, D., Grynberg, A. et Demaison, L.** (1998). Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**: 728-736.

**Shiels, H.A., Blank, J.M., Farrell, A.P., et Block, B.A.** (2004). Electrophysiological properties of the L-type  $Ca^{2+}$  current in cardiomyocytes from bluefin tuna and Pacific mackerel. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**: 659-668.

**Shiels, H.A., Vornanen, M., et Farrell, A.P.** (2000). Temperature-dependance of L-type  $Ca^{2+}$  channel current in atrial myocytes from rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **203**: 2771-2780.

**Shimada, T., et Somlyo, P.** (1992). Modulation of voltage-dependant Ca channel current by arachidonic acid and other long-chain fatty acids in rabbit intestinal smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* **100**: 27-44.

**Sidell, B.D. et Driedzic, W.R.** (1985). Relationship between cardiac energy metabolism and cardiac work demand in fishes. In: *Circulation, Respiration and Metabolism* (ed. G. Gilles), pp. 381-401. Berlin: Springer-Verlag.

**Simmerman, H.K.B. et Jones, L.R.** (1998). Phospholamban: Protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol. Rev.* **78**(4): 921-947.

**Slater, S.J., Kelly, M.B., Taddeo, F.J., Ho, C., Rubin, E. et Stubbs, C.D.** (1994). The modulation of protein kinase C activity by membrane lipid bilayer structure. *J. Biol. Chem.* **269**(7): 4866-4871.

- Snyders, D.J.** (1999). Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **42(2)**: 377-390.
- Spector, A.A.** (1968). The transport and utilisation of free fatty acids. *Ann. NY. Acad. Sci.* **149**: 768-783.
- Squier, T.C., Bigelow, D.J. et Thomas, D.D.** (1988). Lipid fluidity directly modulate the overall protein rotational mobility of the Ca-ATPase in the sarcoplasmique reticulum. *J. Biol. Chem.* **263(19)**: 9178-9186.
- Stewart, J., et Driedzic, W.** (1988). Fatty acid binding proteins in teleost fish. *Can. J. Zoo.* **66**: 2671-2675.
- Stillwell, W. et Wassall, S.R.** (2003). Docosaehaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* **126**: 1-27.
- Swan, J.S., Dibb, K., Negretti, N., O'Neill, S.C. et Sitsapesan, R.** (2003). Effects of eicosapentaenoic acid on cardiac SR Ca<sup>2+</sup>-release and ryanodine receptor function. *Cardiovasc. Res.* **60**: 337-346.
- Taylor, E.W., Jordan, D., et Coote, J.H.** (1999). Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol. Rev.* **79**: 855-916.
- Thomas, M.J., Hamman, B.N. et Tibbits, G.F.** (1996). Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish and hagfish. *J. Exp. Biol.* **199**: 1999-2009.
- Thomas, S. et Perry, S.F.** (1992). Control and consequences of adrenergic activation of red blood cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange on blood oxygen and carbon dioxide transport in fish. *J. Exp. Zool.* **263**: 160-175.
- Thorarensen, H., Gallagher, P.E. et Farrell, A. P.** (1996) Cardiac output in swimming rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, acclimated to seawater. *Physiol. Zool.* **69**: 139-153
- Thorarensen, H., Gallagher, P.E., et Farrell, A.P.** (1996a). The limitations of heart rate as a predictor of metabolic rate in fish. *J. Fish. Biol.* **49**: 226-236.
- Tibbits, G.F., Moyes, C.D., et Hove-Madsen, L.** (1992). Excitation-contraction coupling in the teleost heart. In: *Fish Physiology* (ed. W.S Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell), pp. 267-296. Academic press.
- Tocher, D.R.** (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* **11**: 107-184.
- Tota, B.** (1989). Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. *J. Exp. Zool., Suppl.* **2**, 122-135.

## V-W-X

- Van Den Thillart, G. et Van Raaij, M.T.M.** (1995). Endogenous fuels: non-invasive versus invasive approaches. In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Vol 4 (ed. Hochachka, et Mommsen), pp 33-63, Academic Press, New York.

- Van Der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C., Stam, H.C.G. et Reneman, R.S.** (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.* **72(4)**: 881-940.
- Van Raaij, M.T.M., Bakker, E., Nieven, M.C., Zirczee, H. Et Van den Thillart, G.E.E.J.M.** (1994a). Energy status and free fatty acid patterns in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) during severe oxygen restriction. *Comp. Biochem. Physiol.* **109(A)**: 755-767.
- Van Raaij, M.T.M., Breukel, B.J., Van Den Thillat, G.E.E.J.M. et Addink, A.D.F.** (1994b). Lipid metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.) during normoxia and anoxia. Indication for fatty acid chain elongation. *Comp. Biochem. Physiol.* **107(B)**: 75-84.
- Van Raaij, M.T.M., Van Den Thillart, G.E.E.J.M., Hallemeesch, M., Balm, P.H.M. et Steffens, A.B.** (1995). Effects of arterially infused catecholamines and insulin on plasma glucose and free fatty acids in carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **268**: 1163-1170.
- Van Raaij, M.T.M., Van Den Thillart, G.E.E.J.M., Vianen, G.J., Pit, D.S.S. et Balm, P.H.M.** (1996). Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) and common carp (*Cyprinus carpio*, L.) during deep hypoxia and subsequent recovery. *J. Comp. Physiol.* **166(B)**: 443-452.
- Vassort, G., et Alvarez, J.** (1994). Cardiac T-type calcium current: Pharmacology and roles in cardiac tissues. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **5**: 376-393.
- Vayda, M.E., Londraville, R.L., Cashon, R.E., Costello, L., et Sidell, D.** (1998). Two distinct types of fatty acid-binding protein are expressed in heart ventricle of Antarctic teleost fishes. *Biochem. J.* **330**: 375-382.
- Verkerk, A., Veldkamp, M.W., Baartscheer, A., Schumacher, C.A., Klopping, C., Van Ginneken, A.C. et Ravesloot, J.H.** (2001). Ionic mechanism of delayed afterdepolarizations in ventricular cells isolated from human end-stage failing hearts. *Circulation* **104**: 2728-2733.
- Verkerk, A.O., Veldkamp, M.W., Bouman, L.N. et Van Ginneken, A.C.** (2000). Calcium activated Cl<sup>-</sup> current contributes to delayed afterdepolarizations in single purkinje and ventricular myocytes. *Circulation* **101**: 2639-2644.
- Videler, J.J.** (1993). *Fish Swimming*. Chapman and Hall, London.
- Vornanen, M.** (1989). Regulation of contractility of the fish (*Carassius carassius*) heart ventricle. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* **94**: 477-483.
- Vornanen, M.** (1997). Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **272**: 1432-1440.
- Vornanen, M.** (1998). L-type Ca<sup>2+</sup> current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and  $\beta$ -adrenergic stimulation. *J. Exp. Physiol.* **201**: 533-547.
- Vornanen, M., et Tuomennoro, J.** (1999). Effects of acute anoxia on heart function in crucian carp: importance of cholinergic and purinergic control. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **277**: 465-475.

- Vornanen, M., Ryökkinen, A., et Nurmi, A.** (2002a). Temperature-dependent expression of sarcolemmal K<sup>+</sup> currents in rainbow trout atrial and ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **282**: 1191-1199.
- Vornanen, M., Shiels, H.A., et Farrell, A.P.** (2002b). Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **132**: 827-846.
- Wagner, G.N., Balfry, S.K., Higgs, D.A., Lall, S.P. et Farrell, A.P.** (2004). Dietary fatty acid composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* **137(A)**: 567-576.
- Wallrecht, E.E. et Babin, P.J.** (1994). Thermal adaptation affects the fatty acid composition of plasma phospholipids in trout. *Lipids* **29**: 373-376.
- Wasser, J.S., Guthrie, S.S., et Chari, M.** (1997). In vitro tolerance to anoxia and ischemia in isolated hearts from hypoxia sensitive and hypoxia tolerant turtles. *Comp. Biochem. Physiol.* **118(A)**: 1359-1370.
- Watanabe, T.** (1982). Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**: 3-15.
- Webb, P. W.** (1998). Swimming. In: *The physiology of fishes* (ed D.H. Evans), pp. 3-24. New York: CRC Marine science series.
- Webb, P.W.** (1993). Swimming. In: *The Physiology of Fishes* (ed D.D. Evans), pp. 47-73. Boca Raton, Ca: CRC Press.
- Weber, J.M., Brichon, G., Bodennec, J., et Zwingelstein, G.** (2002). Palmitate and oleate metabolism of rainbow trout in vivo. *Comp. Biochem. Physiol.* **131(A)**: 409-416.
- White, A. et Fletcher, T.C.** (1989). The effect of physical disturbance, hypoxia and stress hormones on serum components of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93(A)**: 455-461.
- Williams, E.E. et Hazel, J.R.** (1992). The role of docosahexaenoic-acid containing molecular species in the thermal adaptation of biological membranes. In: *Essential fatty acids and eicosanoids* (ed. by A. Sinclair et R. Gibson), pp 128-132. American oil chemists' society, Champaign, Illinois.
- Xiao, Y-F., Gomez, A.M., Morgan, J.P., Lederer, W.J., et Leaf, A.** (1997). Suppression of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4182-4187.
- Xiao, Y-F., Kang, J.X., Morgan, J.P., et Leaf, A.** (1995). Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na<sup>+</sup> channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11000-11004.
- Xiao, Y-F., Ke, Q., Wang, S-Y., Yang, Chen, Y., Wang, G.K., Morgan, J.P., Cox, B., et Leaf, A.** (2004). Electrophysiologic properties of lidocaine, cocaine, and n-3 fatty acids block of cardiac Na<sup>+</sup> channels. *European J. Pharmacol.* **485**: 31-41.

**Xiao, Y-F., Morgan, J.P., et Leaf, A.** (2002). Effects of polyunsaturated fatty acids on cardiac voltage-activated  $K^+$  currents in adult ferret cardiomyocytes. *Acta. Physiol. Sinica.* **54**: 271-281.

**Xiao, Y-F., Wright, S.N., Wang, G.K., Morgan, J.P., et Leaf, A.** (1998). N-3 fatty acids suppress voltage-gated  $Na^+$  currents in HEK293t cells transfected with the  $\alpha$ -subunit of the human cardiac  $Na^+$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2680-2685.

**Xiao, Y-F., Wright, S.T., Wang, G.K., Morgan, J.P., et Leaf, A.** (2000). Coexpression with  $\beta_1$ -subunit modifies the kinetics and fatty acid block of  $hH1_\alpha$   $Na^+$  channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**: H35-H46.

**Xue, X-H., Hryshko, L.V., Nicoll, D.A., Philipson, K.D. et Tibbits, G.F.** (1999). Cloning, expression and characterization of the trout cardiac  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **277(46)**: 693-700.

## Y-Z

**Yang, H., Velema, J., Hedrick, M.S., Tibbits, G.F., et Moyes, C.D.** (2000). Evolutionary and physiological variation in cardiac troponin C in relation to thermal strategies of fish. *Physiol. Biochem. Zool.* **73**: 841-849.

**Yue-Jin, W., et Anderson, M.E.** (2001). Transient inward current, delayed afterdepolarisations, and calmodulin kinase. *Chinese Journal of Pharmacology and toxicology* **15(2)**: 88-94.

**Zhou, Z. et January, C.T.** (1998). Both T- and L-type  $Ca^{2+}$  channels can contribute to excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje cells. *Biophys. J.* **74**: 1830-1939.

**Zong, S., Zhou, J., et Tanabe, T.** (1994). Molecular determination of calcium-dependent inactivation in cardiac L-type calcium channels. *B. B. R. C.* **201**: 1117-1123.

**Zwingelstein, G., Bodennec, J., Brichon, G., Abdul-Malak, N., Chapelle, S, et El-Babili, M.** (1998a). Formation of phospholipid nitrogenous bases in euryhaline fish and crustaceans. I. Effects of salinity and temperature on synthesis of phosphatidylserine and its decarboxylation. *Comp. Biochem. Physiol.* **120(B)**: 467-473.

**Zwingelstein, G., Brichon, G., Bodennec, J., Chapelle, S., Abdul-Malak, N., et El-Babili, M.** (1998b). Formation of phospholipid nitrogenous bases in euryhaline fish and crustaceans. II. Phosphatidylethanolamine methylation in liver and hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.* **120(B)**: 475-482.

# *Résumé*

## Résumé

La qualité du régime alimentaire, et en particulier sa composition en acides gras, est un facteur environnemental émergeant en tant que source de diversité physiologique. En effet, de nombreux travaux montrent que la composition en acides gras de l'alimentation influence les performances cardiaques et métaboliques des organismes. Le cœur joue un rôle central dans l'adaptation des poissons à leur environnement en assurant et en régulant, les flux internes d'énergie et de matière. Dans le contexte de l'adaptation environnementale des individus et de l'évolution des espèces, la compréhension des origines de la variabilité interindividuelle et notamment de l'influence exercée par les acides gras sur le fonctionnement du système cardio-respiratoire est un élément important.

L'objectif de ce travail réalisé sur le bar européen (*Dicentrarchus labrax*) a été d'étudier, à deux niveaux organisationnels (organe, cellule), les effets de la composition en acides gras de l'alimentation et des tissus sur:

- les performances cardio-respiratoires mesurées au cours d'un effort musculaire et d'une épreuve d'hypoxie.
- l'activité des canaux calciques de type L des myocytes ventriculaires.

Les bars ont été nourris avec trois alimentations enrichies soit huile de poissons (riche en acides gras n-3 poly-insaturés), soit en huile de colza (riche en acide oléique et linoléique) ou encore en huile de palme (riche en acides gras saturés).

L'étude à l'échelle de l'animal entier, réalisée au moyen d'un respiromètre de type Brett, a permis de mettre en évidence une modification significative des performances cardio-respiratoires des bars en fonction de la composition en acides gras de l'alimentation. Une forte teneur en acide oléique dans l'alimentation et donc dans les tissus cardiaques est toujours associée à de meilleures performances cardiaques et métaboliques. Au cours de l'épreuve d'hypoxie, aucune différence ne fut mise en évidence entre les différentes alimentations.

L'étude électrophysiologique du canal calcique de type L a été réalisée grâce à la technique du patch clamp en configuration « whole-cell ». Nos résultats ont révélé que la perfusion d'acide oléique, ainsi qu'une teneur élevée de cet acide gras dans les membranes, pouvait induire une inhibition de l'influx des ions calcium *via* le courant calcique de type L. Cette baisse n'est accompagnée d'aucune modification majeure des paramètres d'activation et d'inactivation du canal.

De par ses caractéristiques morphofonctionnelles, le cœur est responsable de la limitation des performances métaboliques et natatoire des poissons. Au cours d'un effort musculaire intense, la diminution du niveau d'oxygénation du sang veineux (source principale d'oxygène du tissu myocardique) va conduire à une hypoxie à l'échelle des cardiomyocytes. Cette baisse de l'oxygénation du myocarde conduit à des dérèglements de l'homéostasie calcique responsables d'une élévation du calcium cellulaire et de l'apparition d'arythmies. Les résultats expérimentaux obtenus suggèrent que l'acide oléique, par son action inhibitrice sur le courant calcique de type L, permet de limiter les risques d'apparition de ces arythmies. Cet effet protecteur de l'acide oléique serait responsable des performances cardio-respiratoires et natatoires observées chez les animaux nourris avec le régime enrichi en huile de colza.

**Mots clés:** acides gras, cœur, métabolisme, nage, calcium, canal calcique de type L, acide oléique, hypoxie, arythmie cardiaque, *Dicentrarchus labrax*.

---

## Abstract

Diet quality, and particularly fatty acids composition, is an environmental factor that is emerging as a significant source of physiological diversity. Indeed, numerous recent studies show that the fatty acid composition of the diet influences cardiac and metabolic performances of organisms. Because it is involved in the control and regulation of internal flow of matter and energy, the heart is believed to play a central role in environmental adaptation in fish. Within the double context of adaptation of individuals to their ecological niche and species evolution, understanding sources of interindividual variability and particularly fatty acid influences on the cardiorespiratory system is essential.

The objective of the study was to investigate in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and at two organisational levels, the effects of fatty acids on:

- cardio-respiratory performance during a force swim test and a hypoxic test
- L-type calcium channel activity of ventricular myocytes.

Sea bass were fed with three different diets enriched with fish oil (rich in n-3 polyunsaturated fatty acid), canola oil (rich in oleic acid and linoleic acid) or palm oil (rich in saturated fatty acid).

The study carried out at the whole animal scale was performed using a Brett respirometer. This study shows that dietary fatty acid composition significantly affects sea bass cardio-respiratory performances. Oleic acid content in the diet but also in the cardiac tissue is associated with improved cardiac and metabolic performance. The hypoxic test revealed no significant difference between experimental diets.

Electrophysiological studies on L-type calcium channel were performed using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Our results reveal that both oleic acid perfusion and high membrane content of oleic acid induce a reduction in calcium influx through the sarcolemma via L-type calcium current conductance. This decrease is not accompanied change in activation and inactivation parameters of the current.

Owing to its morpho-functional characteristics, the heart is believed to be the weak link of metabolic and swimming performance in fishes. During an intensive muscular challenge, the decrease in oxygen venous blood (the main source of oxygen for the myocardial tissue) leads to cardiomyocytes hypoxia. Cardiac hypoxia are associated with perturbations of intra-cellular calcium homeostasis with cell calcium overload and arrhythmias. Experimental results suggest that oleic acid, by inhibiting L type calcium current, limit cardiac arrhythmia occurrence. This protective effect of oleic acid could be responsible for the observed improved cardio-respiratory and swimming performance in animals fed with the diet enriched with canola oil.

**Key words:** Fatty acid, heart, metabolism, calcium, L-type calcium channel, oleic acid, hypoxia, cardiac arrhythmias, *Dicentrarchus labrax*.