



Supplémentation nutritionnelle en arginine chez des sujets sains présentant des facteurs de risque liés au syndrome métabolique : métabolisme de l'arginine alimentaire et impact sur la fonction endothéliale

Ambre Deveaux

► To cite this version:

Ambre Deveaux. Supplémentation nutritionnelle en arginine chez des sujets sains présentant des facteurs de risque liés au syndrome métabolique : métabolisme de l'arginine alimentaire et impact sur la fonction endothéliale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLA001 . tel-01755149

HAL Id: tel-01755149

<https://theses.hal.science/tel-01755149>

Submitted on 30 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A AGROPARISTECH
(INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE
L'ENVIRONNEMENT)**

ÉCOLE DOCTORALE ABIES
Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Nutrition

Par

Mme Ambre Deveaux

**Supplémentation nutritionnelle en arginine chez des sujets sains présentant des
facteurs de risque liés au syndrome métabolique : métabolisme de l'arginine
alimentaire et impact sur la fonction endothéliale**

Directeur de thèse : **François MARIOTTI**

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 01 avril 2016 :

Composition du Jury :

M. Jean-François HUNEAU, Professeur, UMR 914, INRA-AgroParisTech
M. Jean-Pascal DE BANDT, Professeur, EA 4466 – PRETRAM, Paris-Descartes
Mme Christine MORAND, Directrice de Recherche, UMR 1019, INRA
Mme Catherine VERGELY, Professeure, UMR 866, INSERM
M. Hubert DABIRE, Chargé de Recherche, U955, INSERM
M. François MARIOTTI, Maître de Conférences, UMR 914, INRA-AgroParisTech
Mme Frédérique LANTOINE-ADAM, Docteure, Institut de Recherche Pierre Fabre

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse
Invitée

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au sein de l'UMR 914 INRA-AgroParisTech « Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire », dans le cadre d'un financement alloué par l'Institut de Recherche Pierre Fabre.

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Pascal De Bandt et Christine Morand d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, Catherine Vergely et Emmanuel Cosson, d'avoir accepté d'en être les examinateurs, ainsi que Frédérique Lantoine-Adam pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'invitée.

Je suis également très reconnaissante au Pr. Daniel Tomé de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Un grand merci à François Mariotti, directeur de cette thèse, pour la qualité de son encadrement scientifique et qui m'a fait confiance pour la réalisation de ce projet, au cours de ces 3 ans et demi. Je le remercie énormément de m'avoir fait partager ses connaissances et compétences en nutrition. J'ai beaucoup appris à travers nos échanges. Je lui suis en particulier très reconnaissante pour sa grande disponibilité tout au long de ce travail et pour son soutien, sa sympathie et son humour au quotidien.

Je tiens également à remercier les chercheurs de l'équipe "Protéines, métabolisme des acides aminés et prévention du syndrome métabolique", Hélène Fouillet, Jean-François Huneau, Dominique Hermier et Annie Quignard-Boulanger, pour leurs conseils, leur implication au sein de mon travail et leurs encouragements à différentes étapes de ma thèse.

Je suis extrêmement reconnaissante à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail. Je remercie chaleureusement Nadezda Khodorova de m'avoir initiée et formée à la spectrométrie de masse. Un grand merci à Véronique Mathé et à Caroline Leroy, Amandine Langelé, Vanessa Das Neves, Klervia Smadja ainsi qu'à Angélique Foucault-Simonin pour leur aide technique très précieuse lors des expérimentations. Merci également à Samira, Hermione, Xi, Benjamin et Sébastien qui ont participé en tant que stagiaires à ce projet.

Je remercie le Centre de Recherche sur Volontaires de l'hôpital AP-HP Avicenne à Bobigny, et plus particulièrement le Dr. Robert Benamouzig et le Dr. Gheorghe Airinei pour nous avoir accueillis chaleureusement et nous avoir permis la réalisation de nos deux études cliniques. Je remercie sincèrement Marie-Claude pour son aide précieuse dans la mise en place des études cliniques ainsi que pour sa gentillesse et sa bonne humeur au quotidien, ainsi

que l'ensemble des personnes du Centre qui ont aidé à la bonne réalisation de ce projet, toujours dans la bonne ambiance, Mourad, Amel, Chin, Abdel, Freddy.

Je remercie Maryse Guérin, Sophie Tesseraud et Dominique Hermier pour avoir fait partie de mon comité de thèse et dont les conseils ont contribué à l'avancement de ce projet.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Frédérique Lantoine-Adam, Etienne André et Pierre Bunouf (Institut de Recherche Pierre Fabre, Castres) pour leur collaboration et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, et je suis très reconnaissante à l'Institut de Recherche Pierre Fabre d'avoir assuré le support financier de ce travail.

Je souhaite remercier Nadine Mézière et Collette Mustière (UMR PEGASE, Saint-Gilles), Dimitrios Tsikas (Centre of Pharmacology and Toxicology, Allemagne) et Klaus Petzke (German Institute of Nutrition, Allemagne) pour les dosages qu'ils ont effectués et qui ont permis l'avancement de cette thèse, ainsi que Sheila West (Departments of Nutritional Sciences and Biobehavioral Health, USA) pour ces précieux conseils scientifiques.

Enfin, je tiens à remercier très sincèrement tous les membres du laboratoire pour leur accueil, leur sympathie. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à vos côtés tous les jours. Merci pour les barbecues, les repas de Noël, pour les conversations sans queue ni tête du déjeuner et j'en oublie. Tout ça, toujours dans la joie et la bonne humeur. Un clin d'œil particulier à Véronique Mathé pour ne m'avoir jamais oublié dans le planning vaisselle.

Enfin un ENORME merci à tous les doctorants, anciens et actuels, Marion, Clélia, Olga, Tristan, Martin, Gabrielle, Simon, Caroline, Odile, Marion O et Marion S, Emilien et Eric pour toutes ces journées de travail partagées, qui ont su supporté mes râlements incessants et qui ont su me soutenir et me remonter le moral le moment venu, pour tous ces fous rires, pour tous ces repas thésards, ces soirées et nos pauses grignotage très récurrentes. Ces 3 années et demi n'auraient vraiment pas été les mêmes sans vous. Un merci tout particulier pour Clélia et Marion et pour leurs pâtisseries cuisinées avec amour.

Et parce que malgré tout, il n'y a pas eu que l'arginine et le syndrome métabolique pendant ces 3 années et demie, je finirai en remerciant ma famille et mes amis qui m'ont apporté tout leur soutien et leur amour au cours de cette thèse. Donc merci à Jérémy, Laurent, Amandine, Julie, Luisa, Célia, Sylvain, Shulong, Vanessa, Christophe et pardon tous ceux que je ne peux citer. Vous avez toujours répondu présents pour me changer les idées avec un verre, un dîner, un ciné, un parc d'attraction et toutes les idées qui vous sont passées par la tête. Enfin merci à mes parents, mon frère, ma tante et ma grand-mère pour leur soutien sans faille, merci d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin. Je finirai donc avec un immense Merci à vous TOUS, vous tous qui avez fait partie de ce tumultueux périple !

RESUME

La dysfonction endothéliale vasculaire, processus majeur initiant l'athérosclérose, est étroitement liée à l'altération de la synthèse et/ou biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), dont l'arginine est le précurseur. Elle apparaît aussi dès la phase postprandiale après un repas gras et sucré. Chez des sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique, une supplémentation orale en arginine a un effet bénéfique sur des fonctions associées au NO. Aucune donnée ne permet cependant de lier la mise à disposition de l'arginine et la synthèse de NO, en situation normale ou de risque cardiométabolique. De plus, peu d'études ont étudié l'effet d'une supplémentation en arginine, dans un contexte nutritionnel (faible dose et libération lente) chez des sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique. Ce travail vise donc à évaluer l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en arginine, sur le métabolisme de l'arginine et la fonction endothéliale (FE), chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Dans une première étude clinique, nous avons ainsi comparé la biodisponibilité de l'arginine ingérée et son utilisation pour la synthèse de NO, selon la présence de facteurs de risque cardiométabolique, et selon qu'elle était consommée sous une forme à libération immédiate (LI) ou sous une forme à libération prolongée (LP), mimant la mise à disposition naturelle de l'arginine alimentaire. Puis, dans une deuxième étude clinique, nous avons étudié l'effet de la supplémentation en arginine LP sur la FE à jeun et sur son altération postprandiale, chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique ; et si cet effet pourrait varier selon leur argininémie basale. Ce travail de thèse a ainsi mis en évidence une utilisation de l'arginine ingérée plus élevée pour la synthèse de NO chez les sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique, et plus élevée avec la forme LP qu'avec la forme LI, en particulier chez ces sujets à risque. La deuxième étude, quant à elle, a révélé que les effets de la supplémentation en arginine-LP variaient selon l'argininémie basale des sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Chez les sujets avec une argininémie basale relativement plus faible, l'arginine-LP a atténué la diminution postprandiale de la FE et a conduit à une FE significativement meilleure à la fin de la période postprandiale.

Mots clés : monoxyde d'azote, métabolisme de l'arginine, supplémentation en arginine, isotopes stables, syndrome métabolique, fonction endothéliale, période postprandiale.

ABSTRACT

Vascular endothelial dysfunction, the hallmark of early atherosclerosis, results from an impairment of the synthesis and/or bioavailability of nitric oxide (NO), the precursor of which is arginine. Endothelial dysfunction is also known to be induced transiently by a high-fat meal. In subject with cardiometabolic risk factors, oral arginine supplementation has a beneficial effect on NO-related physiological functions. However, no data relates the availability of arginine to the synthesis of NO in normal or cardiometabolic risk condition. In addition, few studies only have investigated the effect of arginine supplementation in a nutritional context (low dose and slow release) in subjects with cardiometabolic risk factors. This work aims to evaluate the effect of a nutritional arginine supplementation, on the arginine metabolism and endothelial function in healthy subjects with cardiometabolic risk factors. In a first clinical study, we have compared the bioavailability of oral arginine and its utilization for NO synthesis, as a function of the presence of cardiometabolic risk factors, and as a function of the form of release (immediate release, IR, as free arginine, or sustained release, SR, which mimics the slow release of dietary arginine). Then, in a second clinical study, we studied the effect of SR-arginine supplementation on fasting endothelial function and its postprandial alteration in healthy subjects with cardiometabolic factors. A further aim was to investigate whether this effect may vary according to the baseline arginine status of subjects. This thesis work has demonstrated a higher utilization of oral arginine for NO synthesis in subjects with cardiometabolic risk factors, and a higher utilization with the SR form, particularly in these subjects at risk. As to the second study, it showed that the SR-arginine supplementation effects largely varied with baseline fasting arginine concentration of subjects with cardiometabolic risk factors. In subjects with a relatively lower baseline arginine concentration, SR-arginine attenuated the decrease in postprandial endothelial function and led to a significantly higher endothelial function at the end of the postprandial period.

Key words: nitric oxide, arginine metabolism, arginine supplementation, stable isotopes, metabolic syndrome, endothelial function, postprandial period.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
RESUME	4
ABSTRACT	5
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	15
INTRODUCTION GENERALE	16
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	18
A. Fonction endothéliale et risque cardiovasculaire : le rôle central du monoxyde d'azote	18
1. Fonction endothéliale vasculaire : rôle de l'endothélium.....	18
1.1. Contrôle de la perméabilité vasculaire.....	18
1.2. Régulation du tonus vasculaire	19
1.3. Rôle dans les processus inflammatoires et immunologiques	19
1.4. Rôle dans la coagulation et la fibrinolyse.....	20
2. Le NO, molécule clé dans l'homéostasie vasculaire.....	20
2.1. Métabolisme du NO	21
2.1.1. Synthèse du NO	21
2.1.2. Régulation de la synthèse du NO	22
2.1.3. Régulation de la biodisponibilité du NO.....	25
2.2. Mécanisme d'action du NO au niveau vasculaire et implication dans la fonction endothéliale.....	26
2.2.1. Rôle du NO dans la fonction endothéliale.....	26
2.2.2. Mécanisme d'action du NO	26
3. Dysfonction endothéliale : caractérisation, mécanismes impliqués et conséquences potentielles sur la fonction vasculaire	27
3.1. Phénotype pro-athérogène et activation endothéliale.....	27
3.2. Facteurs de risque cardiovasculaire et dysfonction endothéliale.....	28
3.3. Implication du NO dans la dysfonction endothéliale	29
3.3.1. Diminution de la synthèse du NO.....	29
3.3.2. Augmentation de la dégradation de NO	30
B. Importance de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie du syndrome métabolique	31
1. Définitions du syndrome métabolique et prévalence.....	31

2. La dysfonction endothéliale associée au syndrome métabolique : un rôle physiopathologique de premier plan	32
2.1. Physiopathologie du syndrome métabolique	32
2.2. NO et physiopathologie du syndrome métabolique	35
2.2.1. Implication du NO dans la physiopathologie du syndrome métabolique	35
2.2.2. Dysfonction endothéliale au sein du syndrome métabolique	35
2.2.3. Stress oxydant dans le syndrome métabolique	37
3. Rôle de la dysfonction endothéliale postprandiale dans la physiopathologie du syndrome métabolique	38
3.1. Inflammation à bas bruit et dysfonction endothéliale postprandiale	39
3.2. Stress oxydant et dysfonction endothéliale postprandiale.....	40
3. Rôle d'un apport protéique dans la prévention du syndrome métabolique.	41
C. Intérêt d'un apport en arginine dans la modulation nutritionnelle de la dysfonction endothéliale	41
1. Métabolisme de l'arginine.....	42
1.1. Synthèse endogène, absorption et biodisponibilité de l'arginine.....	42
1.1.1. Sources d'arginine et synthèse endogène	42
1.1.2. Absorption et biodisponibilité de l'arginine	44
1.2. Catabolisme de l'arginine	45
1.2.1. Des voies multiples de catabolisme	45
1.2.2. La voie arginase	46
1.3. Compartimentation du métabolisme de l'arginine	48
2. Rôles physiologiques de l'arginine	49
3. Apport en arginine et modulation de la dysfonction endothéliale.....	50
3.1. Supplémentation orale en arginine chez le sujet à risque	51
3.2. Supplémentation orale en arginine chez le sujet malade.....	53
3.3. Supplémentation orale en arginine chez le sujet sain	54
3.4. L'arginine orale : un bénéfice mais pour quel type de population ?.....	55
4. Mécanismes d'action des effets bénéfiques de l'arginine exogène sur les fonctions associées au NO : paradoxe de l'arginine.....	58
4.1. Colocalisation de CAT-1 et eNOS et compartimentation intracellulaire.....	58
4.2. Inhibition compétitive par des inhibiteurs endogènes	59
4.3. Compétition des voies arginase et NO synthase.....	60
4.4. Découplage de la NO synthase.....	61
4.5. Autres hypothèses.....	62

4.6. Conclusion	62
D. CONCLUSION ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX	64
1. Conclusion	64
2. Hypothèses et objectifs des études	67
E. METHODES D’EVALUATION DE LA SYNTHÈSE/BIODISPONIBILITE DU NO ET DE LA FONCTION ENDOTHELIALE CHEZ L’HOMME	69
1. Evaluation de la synthèse/biodisponibilité du NO	69
1.1. Indicateurs de la capacité de synthèse du NO	69
1.2. Indicateurs de la biodisponibilité du NO	70
2. Méthodes d’exploration de la fonction/dysfonction endothéliale chez l’Homme : généralités 71	
2.1. Méthodes d’exploration indirectes : analyse des marqueurs biologiques	71
2.1.1. Marqueurs solubles d'activation endothéliale et d'inflammation	71
2.1.2. Marqueurs solubles de l'hémostase.....	72
2.1.3. Vasoconstricteurs	72
2.1.4. Autres marqueurs.....	73
2.2. Méthodes d’exploration directes	73
2.2.1. Mesure de la vasodilatation dépendante du flux sanguin par la technique d’écho- doppler 73	
2.2.2. Mesure de l’amplitude du volume digitale par pléthysmographie.....	74
2.2.3. Analyse de la géométrie de l’onde de pouls	75
2.3. Evaluation de la dysfonction endothéliale en termes de risque cardiovasculaire.....	76
CHAPITRE 2: TRAVAUX PERSONNELS	77
A. Choix de la population et du type de supplémentation utilisés pour la réalisation des travaux de thèse.....	77
1. Critères de sélection de la population étudiée	77
2. Choix du type de supplémentation	78
B. Etude 1 : L’arginine orale, particulièrement sous une forme à libération prolongée, est utilisée plus efficacement pour la synthèse de monoxyde d’azote quand les sujets sains présentent des facteurs de risque cardiométabolique	79
1. Eléments de choix méthodologique : méthode de suivi du devenir métabolique de l’arginine ingérée utilisée	81
2. Article 1	83
ANNEXE 1.....	84

C. Etude 2 : La supplémentation en L-arginine atténue la dysfonction endothéliale postprandiale lorsque l'argininémie basale est faible chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique	89
1. Eléments de choix méthodologiques.	91
1.2. Choix du repas de charge	91
1.3. Evaluation physiologique de la fonction endothéliale à jeun et en postprandial.....	91
2. Article 2	93
DISCUSSION GENERALE	94
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	105

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Rôles de l'endothélium vasculaire et médiateurs synthétisés et sécrétés par l'endothélium vasculaire
- Figure 2 : Rôle de l'endothélium dans le maintien du tonus vasculaire
- Figure 3 : Synthèse du NO à partir de la L-arginine
- Figure 4 : Cofacteurs, substrats et produits de la NOS
- Figure 5 : Les trois isoformes de la NOS
- Figure 6 : Mécanismes de régulation de eNOS
- Figure 7 : Cycle d'activation/inactivation de eNOS par des processus de palmitoylation / dépalmitoylation et de phosphorylation / dephosphorylation
- Figure 8 : Schéma simplifié du métabolisme de l'ADMA
- Figure 9 : Couplage/Découplage de eNOS et production d'anions superoxydes
- Figure 10 : Régulation de la biodisponibilité du NO au niveau systémique
- Figure 11 : Réactions impliquant le NO au niveau des érythrocytes
- Figure 12 : Le NO, molécule clé de l'homéostasie vasculaire
- Figure 13 : Voie et mode d'action direct du NO
- Figure 14: Dysfonction endothéliale : phénotype pro-athérogène et activation endothéliale
- Figure 15 : Relations entre le style de vie, les facteurs de risque cardiovasculaires et les maladies cardiovasculaires : rôle précoce de la dysfonction endothéliale
- Figure 16 : Implication de l'homocystéine dans la dysfonction endothéliale
- Figure 17: Mécanismes présumés de l'altération de la biodisponibilité du NO dans les pathologies cardiovasculaires
- Figure 18 : Facteurs de risque cardiovasculaires, stress oxydant et biodisponibilité en NO
- Figure 19 : Représentation schématique de la physiopathologie du syndrome métabolique
- Figure 20 : Le tissu adipeux, un organe endocrine
- Figure 21 : Concentration de nitrites plasmatiques chez les individus sains (controls) ou atteints de syndrome métabolique
- Figure 22 : Synthèse de NO chez les patients obèses présentant un syndrome métabolique
- Figure 23 : Effet de l'inactivation du gène de la eNOS chez la souris sur les composantes du syndrome métabolique
- Figure 24 : Inflammation à bas bruit, dysfonction endothéliale et syndrome métabolique
- Figure 25 : Implication du stress oxydant dans la physiopathologie du syndrome métabolique
- Figure 26 : Concentrations plasmatiques de vitamine C et E chez les individus sains ou atteints de syndrome métabolique.
- Figure 27 : Hyperglycémie et dysfonction endothéliale postprandiale
- Figure 28 : Altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par une charge orale modérée en glucose chez des sujets sains
- Figure 29 : Altération postprandiale de la FMD après l'ingestion d'un repas hyperlipidique ou de faibles doses de lipides
- Figure 30 : Dysfonction endothéliale observée pendant la phase postprandiale
- Figure 31 : Expression de marqueurs pro-inflammatoires au niveau de cellules endothéliales, cultivées en présence de lipoprotéines riches en triglycérides (TGRL)
- Figure 32 : Effet d'un apport en arginine sur la FMD postprandiale de sujets sains
- Figure 33 : Sources de l'arginine
- Figure 34 : Synthèse endogène d'arginine : axe intestinal-rénal
- Figure 35 : Cycle citrulline-NO

Figure 36 : Interactions entre les différentes voies du métabolisme de l'arginine
Figure 37 : Compartimentation du métabolisme de l'arginine au niveau corps entier
Figure 38 : Cycle de l'urée
Figure 39 : Effets cliniques dose-dépendants de l'arginine chez l'Homme
Figure 40: Effets d'une supplémentation en arginine sur la fonction endothéliale et la taille des lésions vasculaires chez des lapins hypercholestérolémiques
Figure 41 : L'ingestion de 15g d'arginine atténue la dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas hyperlipidique
Figure 42 : Colocalisation de eNOS et CAT-1 au sein des cavéoles
Figure 43 : Utilisation préférentielle de l'arginine extracellulaire pour la synthèse de NO
Figure 44 : Paradoxe de l'arginine et ADMA
Figure 45 : Compétition des voies arginase et NO synthase pour la synthèse de NO
Figure 46 : Méthodes de mesure in vivo du NO
Figure 47 : Voie de synthèse et de dégradation du NO
Figure 48 : Deux types de guanylate cyclase au niveau des cellules musculaires lisses
Figure 49 : Impact de la CRP sur l'activation endothéliale
Figure 50 : Rôle du NO dans la FMD
Figure 51 : Technique de mesure de la FMD
Figure 52 : Principe de la mesure du RHI par la technique EndoPAT
Figure 53 : Schéma de l'étude du devenir de l'arginine ingérée par la technique des traceurs
Figure 54 : Schémas du protocole de l'étude n°2 et du déroulement des journées d'exploration avant et après supplémentation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Définitions du syndrome métabolique

Tableau 2 : Effets NO-dépendants et indépendants de l'arginine

Tableau 3 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets à risque cardiovasculaire : hypercholestérolémie et diabète

Tableau 4 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets à risque cardiovasculaire : hypertension, obésité/résistance à l'insuline, tabagisme et âge

Tableau 5 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets malades : maladies des artères coronaires

Tableau 6 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets malades : maladies des artères périphériques et insuffisance cardiaque

Tableau 7 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets sains

Tableau 8 : Facteurs circulants utilisés comme marqueurs de la fonction endothéliale

LISTE DES ABBREVIATIONS

3-NT	: 3-nitrotyrosine
ADMA	: diméthylarginine asymétrique
AGL	: acides gras libres
AI	: augmentation index
AMPc	: adénosine monophosphate cyclique
ANP	: peptide natriurétique atrial
ApoE	: apolipoprotéine E
ASL	: arginosuccinate lyase
ASS	: arginosuccinate synthétase
AUC	: aire sous courbe
B-FGF	: facteur de croissance du fibroblaste
BH4	: tétrahydrobioptérine
CAT-1	: transporteur des acides aminés cationiques de type 1
cNOS	: NO synthases constitutives
CRP	: protéine C-réactive
EDHF	: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
ET-1	: endothéline-1
eNOS	: NO synthase endothéliale
FAD	: flavine adénine dinucléotide
FMD	: flow mediated-dilation ou vasodilatation dépendante du flux sanguin
FMN	: flavine mononucléotide
fRHI	: Framingham reactive hyperemia index ou indice d'hyperémie réactive de Framingham
GABR	: ratio de biodisponibilité globale en arginine ou arginine/[ornithine+citrulline]
GMPc	: guanosine 3,5-monophosphate cyclique
H ₂ O ₂	: peroxyde d'hydrogène
ICAM-1	: molécule d'adhésion intercellulaire-1
IL	: interleukine
iNOS	: NO synthase inductible
LI	: libération immédiate
L-NMMA	: N ^G -monométhyl-L-arginine
LP	: libération prolongée
MCP-1	: protéine chimioattractante des monocytes-1

NADPH : β -nicotinamide adénine dinucléotide
NO : monoxyde d'azote
 NO_2^- : nitrites
 NO_3^- : nitrates
NOx : nitrates + nitrites
NOHA : N^ω -hydroxy-L-arginine
NOS : NO synthase
 O_2^- : anions superoxydes
ONOO $^-$: peroxyxynitrites
PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PAT : tonométrie artérielle périphérique
 PGI_2 : prostacycline
PK : protéine kinase
RHI : reactive hyperemia index ou indice d'hyperémie réactive
RI : reflection index
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RNNO : nitrosamines
RSNO : nitrosothiols
SI : stiffness index
SOD : superoxyde dismutase
TTH : tour de taille hypertriglycéridémique
 $\text{TNF-}\alpha$: tumor necrosis α
t-PA : activateur tissulaire du plasminogène
 TXA_2 : thromboxane A_2
VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

INTRODUCTION GENERALE

Outre son rôle important dans de nombreuses fonctions de l'organisme (1, 2), le monoxyde d'azote (NO) est une molécule signal qui joue un rôle clef dans l'homéostasie vasculaire (3, 4). Le NO contrôle largement la plupart des fonctions de l'endothélium (comme la vasodilatation, l'adhésion des monocytes, ou l'agrégation plaquettaire), que l'on regroupe ainsi sous le terme collectif de «fonction endothéliale» (4-6). La dysfonction endothéliale correspond à l'expression d'un phénotype pro-athérogène au niveau de l'endothélium vasculaire et signe ainsi l'initiation de l'athérosclérose (4, 7, 8). A ce titre, de nombreuses données montrent que la dysfonction endothéliale accompagne la présence de facteurs de risque de maladies cardiovasculaires ou de diabète, comme l'âge, le tabagisme, l'obésité, les dyslipidémies, l'hypertension et l'inflammation à bas bruit (3, 7, 8). Le regroupement de facteurs de risque, comme dans le cas du syndrome métabolique, est a fortiori associé à la présence de la dysfonction endothéliale. Cependant, dans ce cas, la dysfonction endothéliale joue un rôle physiopathologique de premier plan (9-11). Enfin, chez les sujets sains, la dysfonction endothéliale apparaît dès la phase postprandiale après un repas gras et sucré, et de façon encore plus marquée chez les sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique.

L'altération de la synthèse ou de la biodisponibilité du NO est considérée comme la caractéristique principale et déterminante de l'apparition de la dysfonction endothéliale vasculaire (4, 12, 13). Dans le cadre du syndrome métabolique, la participation d'une altération du signal NO semble particulièrement critique. La synthèse de NO est altérée en présence de facteurs de risque contributifs au syndrome métabolique ou d'un syndrome métabolique (14-18). Ainsi, au final, la manipulation de la synthèse et biodisponibilité du NO constitue une cible pour la prévention de l'athérosclérose (13, 19, 20).

La modulation nutritionnelle de la synthèse de NO chez l'homme sain, à risque ou malade a fait l'objet d'un fort intérêt depuis les années 90 (16, 21). L'arginine, un acide aminé présent dans les protéines alimentaires, se trouve être le précurseur biochimique du NO. L'arginine a donc été naturellement considérée depuis longtemps comme un candidat sérieux à cette modulation du signal NO, et il a été constaté que la supplémentation en arginine pouvait moduler, de fait, de nombreuses fonctions associées au NO (22-25). Bien que peu d'études aient été menées à de faibles doses d'arginine (entre 3 et 8 g/j) chez le sujet sain, la littérature n'est pas concluante sur la modification significative de fonctions associées au NO (24, 26-30). A l'inverse, la littérature rapporte un grand nombre de données sur l'effet bénéfique de

fortes doses d'arginine (le plus souvent entre 9 et 24 g/j) chez le sujet à risque ou malade (24, 25). Aucune donnée ne permet cependant de lier la mise à disposition de l'arginine et la synthèse de NO, en situation normale ou de risque cardiométabolique. De plus, peu d'études ont étudié l'effet d'une supplémentation en arginine, notamment au cours de la période postprandiale, dans un contexte nutritionnel (faible dose et libération lente) chez des sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique.

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en arginine; c.-à-d. administrée sous une forme mimant la mise à disposition naturelle de l'arginine alimentaire; sur le métabolisme de l'arginine et la fonction endothéliale à jeun et en postprandial, chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique.

Afin de situer le contexte scientifique de cette thèse, nous présentons dans le premier chapitre de ce manuscrit, un exposé des données de la littérature en trois parties. La première partie expose le rôle central joué par le NO dans la fonction endothéliale ainsi que dans la dysfonction endothéliale. Dans la deuxième partie, nous développons le cas particulier du rôle joué par la dysfonction endothéliale, et notamment la dysfonction endothéliale postprandiale, dans la physiopathologie du syndrome métabolique. Enfin la troisième partie dresse un état des lieux des connaissances actuelles concernant les effets bénéfiques de supplémentations en arginine sur la fonction endothéliale, et sur les mécanismes sous-jacents. L'objectif de ce chapitre introductif est de montrer comment et pourquoi une modulation nutritionnelle de la fonction endothéliale, par l'arginine, peut constituer une bonne stratégie pour prévenir l'apparition d'un syndrome métabolique et de l'athérosclérose. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse.

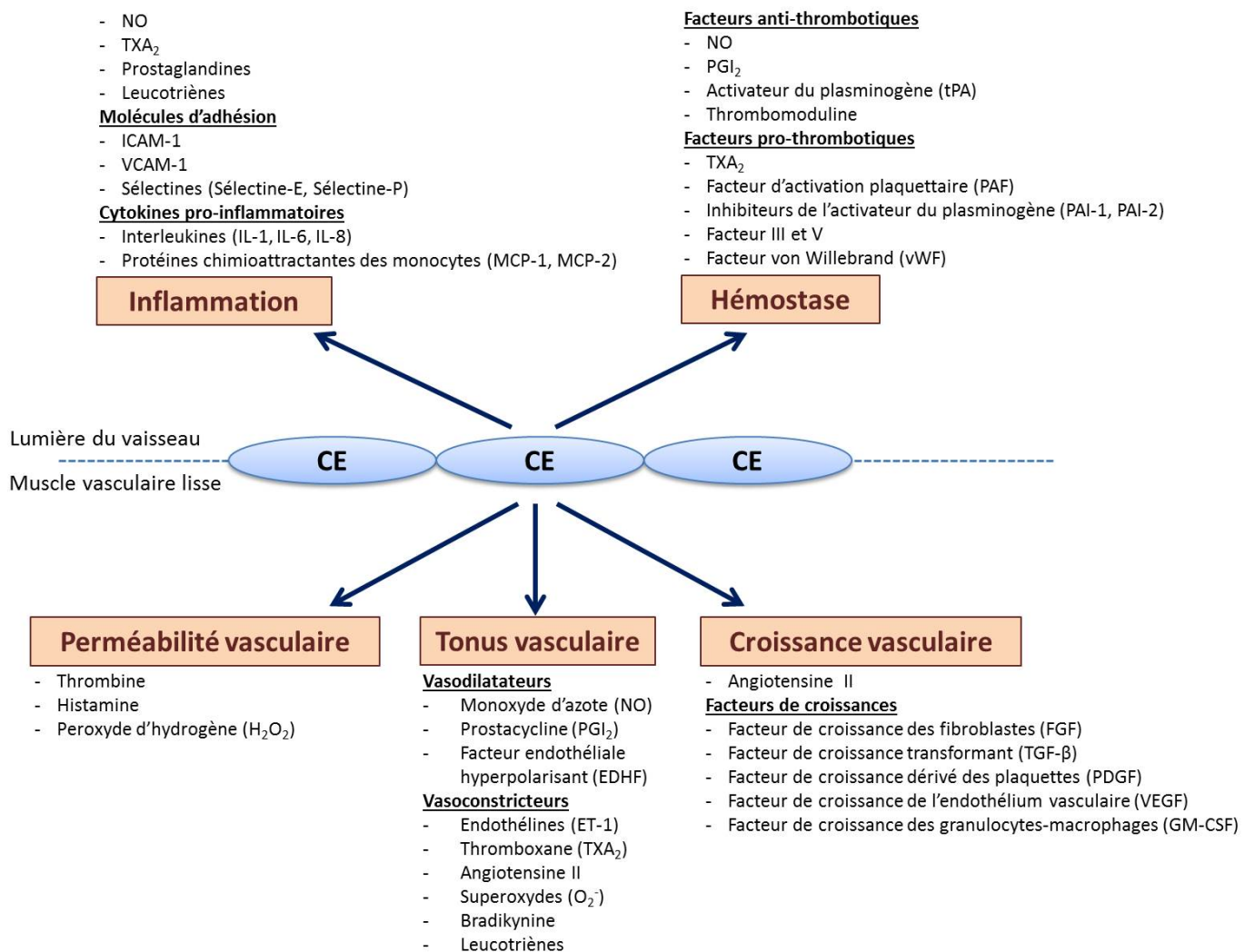


Figure 1 : Rôles de l'endothélium vasculaire et médiateurs synthétisés et sécrétés par l'endothélium vasculaire

CE : cellule endothéliale.

A. Fonction endothéliale et risque cardiovasculaire : le rôle central du monoxyde d'azote

1. Fonction endothéliale vasculaire : rôle de l'endothélium

L'endothélium vasculaire est une monocouche de cellules endothéliales, qui tapisse la lumière des vaisseaux sanguins, et qui constitue une interface vitale entre le sang circulant et les tissus environnants. Jusque dans les années 1960, l'endothélium était considéré comme une simple barrière de diffusion, empêchant l'accès des cellules sanguines à la matrice vasculaire. Par la suite, de nombreuses autres études ont démontré que l'endothélium était un organe endocrine dynamique (31, 32).

Il est maintenant reconnu que les cellules endothéliales; en interagissant avec les cellules circulantes d'une part, et avec les cellules de la paroi vasculaire, c.-à-d. les cellules musculaires lisses, d'autre part (33); jouent un rôle crucial dans le contrôle de la fonction vasculaire afin de maintenir l'homéostasie vasculaire. Par la synthèse et la sécrétion d'un certain nombre de médiateurs, en réponse à des stimuli physiques (contraintes de cisaillement ou « shear-stress »), chimiques (acétylcholine, insuline) ou humoraux, les cellules endothéliales régulent le tonus vasculaire, l'activation et l'adhésion leucocytaires, la perméabilité vasculaire, la prolifération cellulaire ainsi que les mécanismes d'agrégation plaquettaire, de fibrinolyse et de coagulation (33-35) (Figure 1). Certains de ces médiateurs, tels que les protéines de jonction cellulaire ou les molécules d'adhésion, font partie intégrante de la structure des cellules endothéliales. D'autres, tels que le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), les cytokines ou les facteurs impliqués dans l'hémostase, sont produits et libérés par les cellules endothéliales dans la lumière des vaisseaux ou vers les tissus sous-jacents (34). Les mécanismes précis contrôlant cette homéostasie sont complexes et résultent d'interactions entre le sang, l'endothélium et les cellules musculaires lisses.

1.1. Contrôle de la perméabilité vasculaire

L'endothélium vasculaire joue un rôle crucial dans la préservation de la structure et de la fonction de la paroi vasculaire (34). Il forme une barrière relativement imperméable et sélective pour le transport de molécules et de cellules entre le sang et les tissus (33). Les cellules endothéliales sont liées entre elles par différents types de jonctions cellulaires qui régulent l'intégrité de l'endothélium et ainsi la perméabilité endothéliale (33, 34). Trois types

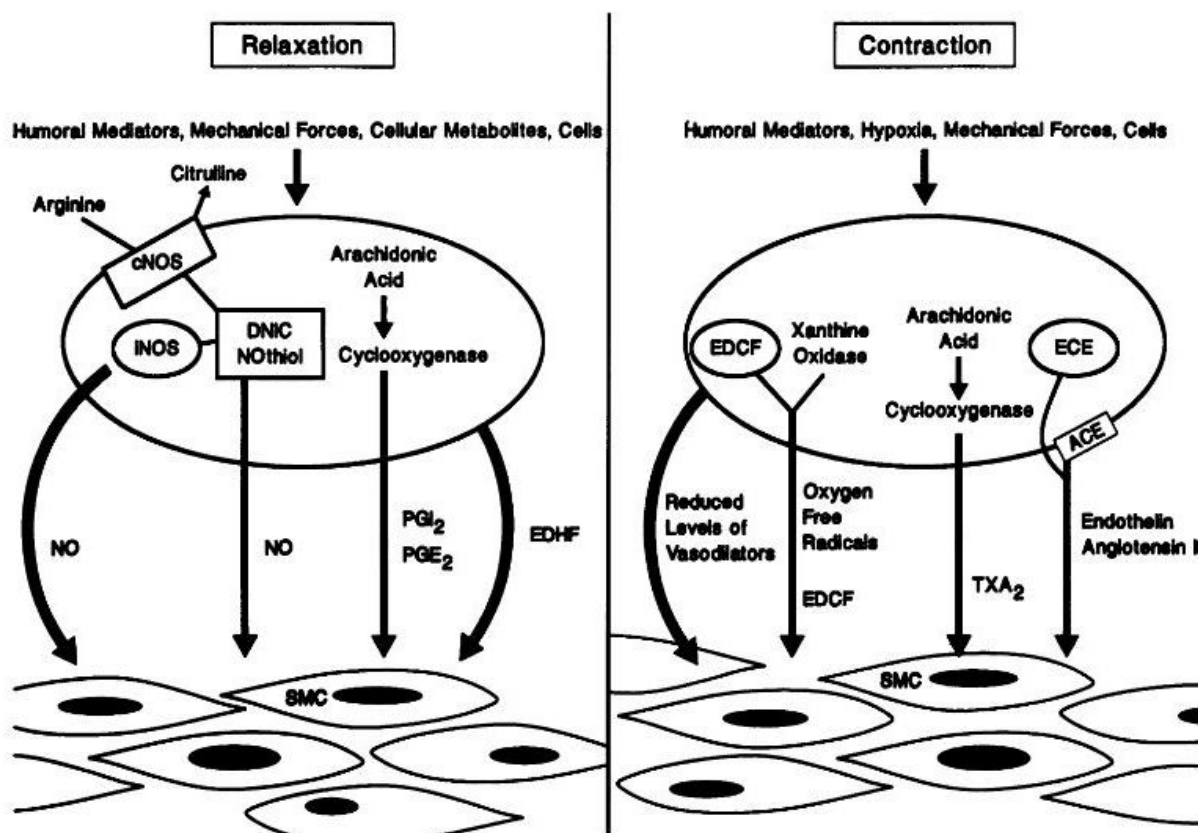


Figure 2 : Rôle de l'endothélium dans le maintien du tonus vasculaire

La relaxation est dépendante du monoxyde d'azote (NO) et d'autres dérivés nitrés, de la prostacycline (PGI₂) et de la prostaglandine E₂ (PGE₂), et du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). La vasoconstriction peut être induite par une réduction de la libération des facteurs vasodilatateurs, par le thromboxane A₂ (TXA₂), les radicaux libres oxygénés, l'angiotensine II, les endothélines, et des facteurs constricteurs dérivés de l'endothélium. L'ensemble des facteurs vaso-actifs peut être influencé par des altérations au niveau des stimuli physiques, chimiques, humoraux et cellulaires. ACE : angiotensin conversion enzyme ou enzyme de conversion de l'angiotensine, cNOS : NO synthase constitutives, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline, iNOS : NO synthase inductible, SMC : smooth muscle cell ou cellules musculaires lisses. *D'après (38).*

de jonctions ont été décrits dans l'endothélium : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (33). Des stimuli comme l'histamine ou la thrombine, induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire et sont généralement produits dans des situations inflammatoires aiguës ou chroniques (33).

1.2. Régulation du tonus vasculaire

L'endothélium joue un double rôle dans la régulation du tonus vasomoteur. Il produit et libère à la fois des facteurs vasoconstricteurs et des facteurs vasodilatateurs (34). Les cellules endothéliales communiquent directement avec les cellules musculaires lisses sous-jacentes, par la diffusion de ces substances vaso-actives qui induisent alors une contraction ou une relaxation vasculaire. En effet, en 1980, Furchgott et Zawadsky ont montré que la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires, en réponse à l'acétylcholine, était dépendante de l'intégrité et de la présence de l'endothélium (36) et en 1982, Vanhoutte et Rubanyi ont démontré que l'endothélium pouvait jouer un rôle non seulement dans la vasodilatation mais aussi la vasoconstriction (37, 38). De manière générale, sept familles de composés ont été associées aux réponses vasomotrices dépendantes de l'endothélium : les prostanoïdes, le NO et les dérivés nitrés, les radicaux libres oxygénés, les endothélines, les angiotensines, les facteurs hyperpolarisants et d'autres facteurs de constriction dérivés de l'endothélium encore non caractérisés. Les principaux facteurs vasoconstricteurs sont le thromboxane A₂ (TXA₂), les anions superoxydes, l'endothéline-1 (ET-1), la prostaglandine H₂ et l'angiotensine II, et les trois principaux facteurs vasodilatateurs sont le NO, la PGI₂ et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Figure 2). En situation physiologique normale, la libération des facteurs vasodilatateurs, en particulier le NO, prédomine sur celle des facteurs vasoconstricteurs (38).

1.3. Rôle dans les processus inflammatoires et immunologiques

En raison de sa position stratégique, l'endothélium joue un rôle important dans la médiation et la modulation des réponses inflammatoires et immunologiques (34, 38). L'interaction entre les cellules endothéliales et les leucocytes, régulée par l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines inflammatoires, joue un rôle clé dans le maintien de ces processus (33, 34). En effet, les cellules endothéliales expriment, de façon constitutive, ou après induction biochimique/mécanique, des molécules d'adhésion aux polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, monocytes et plaquettes. Elles coordonnent ainsi le recrutement des cellules inflammatoires sur les sites d'infection ou de lésion tissulaire, et

produisent et libèrent des cytokines et des facteurs de croissance servant de signaux de communication aux cellules inflammatoires (33, 39). Les trois familles de molécules d'adhésion qui interviennent principalement dans ces processus d'adhésion leucocytaire sont : les sélectines (sélectine-E, sélectine-P), les intégrines (molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1)) et les membres de la superfamille des immunoglobulines (33, 40).

1.4. Rôle dans la coagulation et la fibrinolyse

L'endothélium joue également un rôle clé dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse. Il est ainsi une source de thromborégulateurs qui modulent les phases précoces de la formation de thrombus (38). La surface luminale de l'endothélium sain est anticoagulante et anti-thrombotique (33). Des dommages au niveau des vaisseaux sanguins ou l'exposition à certaines cytokines ou stimuli pro-inflammatoires font pencher la balance vers un phénotype pro-coagulant et pro-thrombotique. Les principaux thromborégulateurs sécrétés par les cellules endothéliales sont le NO et la PGI₂, qui inhibent l'agrégation plaquettaire, et le TXA₂ qui au contraire favorise l'agrégation plaquettaire (33, 38). L'endothélium participe également à la fibrinolyse en libérant l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase, permettant la transformation du plasminogène en plasmine, qui dégrade les thrombus par dégradation du réseau de fibrine. L'inhibiteur naturel du t-PA, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), est également sécrété de manière constitutive par les cellules endothéliales (33, 34). Ainsi, la fibrinolyse dépend essentiellement de la balance entre le t-PA et PAI-1.

L'endothélium maintient donc un équilibre délicat au niveau du réseau vasculaire entre activation et inhibition de la croissance vasculaire, entre vasoconstriction et vasodilatation, entre adhésion ou non des cellules sanguines, et entre pro-coagulation et anti-coagulation grâce à la production et la libération de différents médiateurs, dont le NO qui joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.

2. Le NO, molécule clé dans l'homéostasie vasculaire

Le NO est un gaz possédant une demi-vie de quelques secondes. Soluble à la fois dans les phases aqueuses et hydrophobes, il peut diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires et agir aussi bien au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, que des plaquettes, des érythrocytes et des cellules de l'inflammation. Outre son rôle

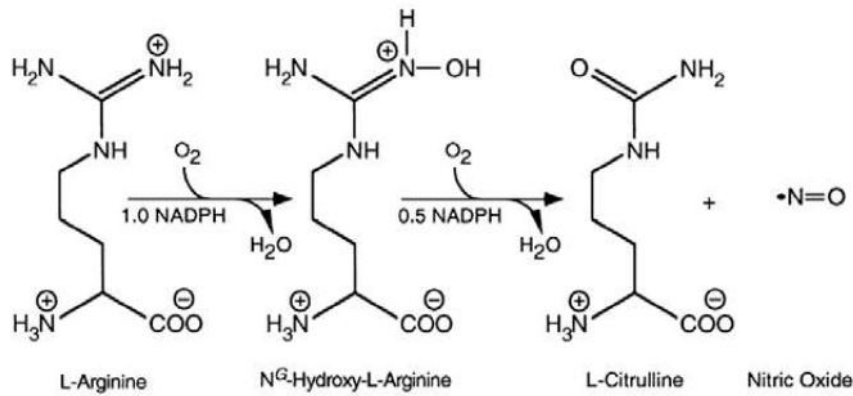


Figure 3 : Synthèse du NO à partir de la L-arginine

D'après (45).

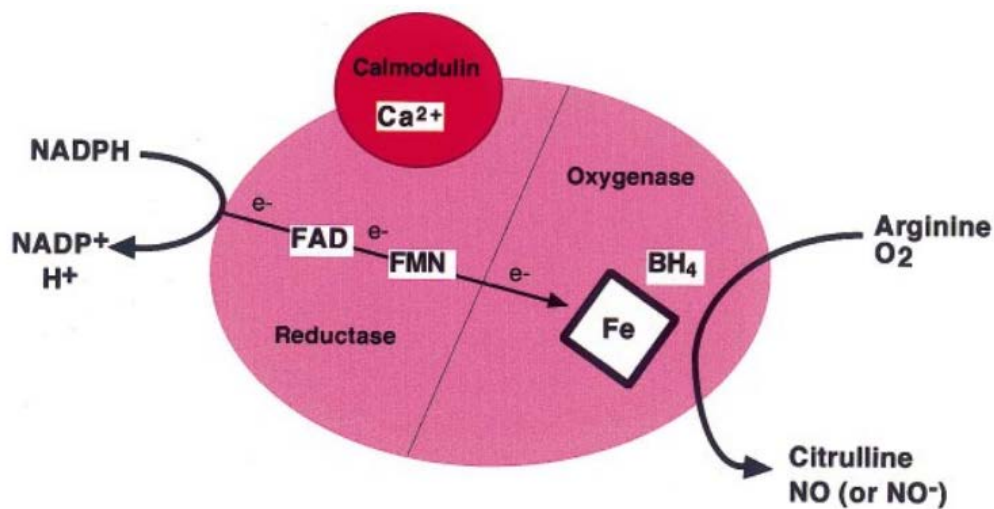


Figure 4 : Cofacteurs, substrats et produits de la NOS

D'après (45).

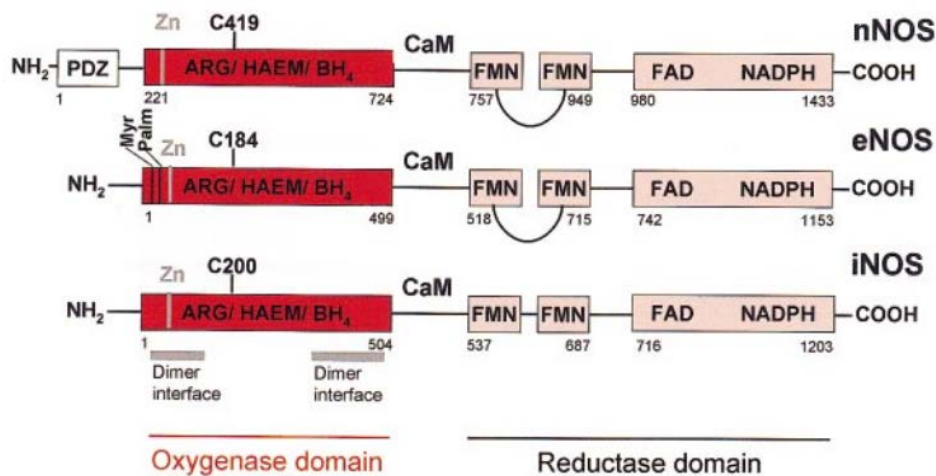


Figure 5 : Les trois isoformes de la NOS

Pour chaque isoforme, neuronale, endothéliale et inducible, les domaines oxygénase N-terminal et réductase C-terminal sont représentés, ainsi que les numéros des résidus acides aminés, l'emplacement du résidu cystéine liant le groupement hème, les sites de palmitoylation (Palm), de myristoylation (Myr) et de fixation des différents cofacteurs. *D'après (45).*

important dans de nombreuses fonctions de l'organisme (1, 2), le NO est une molécule signal qui joue un rôle clé dans l'homéostasie vasculaire (3, 4). Le NO contrôle largement la plupart des fonctions de l'endothélium, comme la vasodilatation, l'adhésion des leucocytes, ou l'agrégation plaquettaire (4-6). Cependant, il convient de garder en mémoire que le NO est aussi une espèce radicalaire qui donne naissance à des produits secondaires extrêmement cytotoxiques, notamment en situation de stress oxydant (41). Les quantités de NO retrouvées dans les cellules endothéliales sont ainsi très faibles et la synthèse de NO extrêmement régulée.

De nombreuses études ont montré, par l'évaluation de multiples marqueurs du métabolisme du NO, qu'une altération de la fonction endothéliale était étroitement associée à une diminution de la synthèse et/ou de la biodisponibilité du NO (12, 42). Il apparaît donc essentiel d'étudier le métabolisme du NO, afin de pouvoir analyser la pertinence de ces différents marqueurs de synthèse/biodisponibilité, et de mieux comprendre la participation du NO dans la dysfonction endothéliale et la physiopathologie du syndrome métabolique.

2.1. Métabolisme du NO

2.1.1. Synthèse du NO

Chez les mammifères, le NO est synthétisé au sein de différents tissus, incluant entre autres l'endothélium vasculaire, les macrophages et les plaquettes (43), par une famille d'enzymes appelées NO synthases (NOS) (44). Les NOS catalysent l'oxydation à 5 électrons de l'atome d'azote terminal du groupement guanidium de la L-arginine, formant ainsi un produit intermédiaire instable, la N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA), qui se scinde rapidement en NO et L-citrulline (Figure 3). La synthèse du NO nécessite comme co-substrats du β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'O₂, et comme cofacteurs, la tétrahydrobioptérine (BH₄), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) (Figure 4) (2, 4).

A ce jour, 3 isoformes de la NOS, codées par des gènes distincts, ont été identifiées (Figure 5) (4, 45). Deux sont constitutives : il s'agit des isoformes nNOS (NOS neuronale ou NOS-1) et eNOS (NOS endothéliale ou NOS-3), regroupées sous le terme cNOS. Une est inductible par des endotoxines bactériennes et des cytokines inflammatoires : il s'agit de l'isoforme iNOS (ou NOS-2). Les NOS se présentent sous forme de dimères, chaque monomère étant associé à une calmoduline (43). Les formes constitutives sont calcium (Ca²⁺)-dépendantes (43) et sont hautement régulées, que ce soit au niveau transcriptionnel (expression et abondance) ou post-traductionnel, générant ainsi de faibles concentrations de

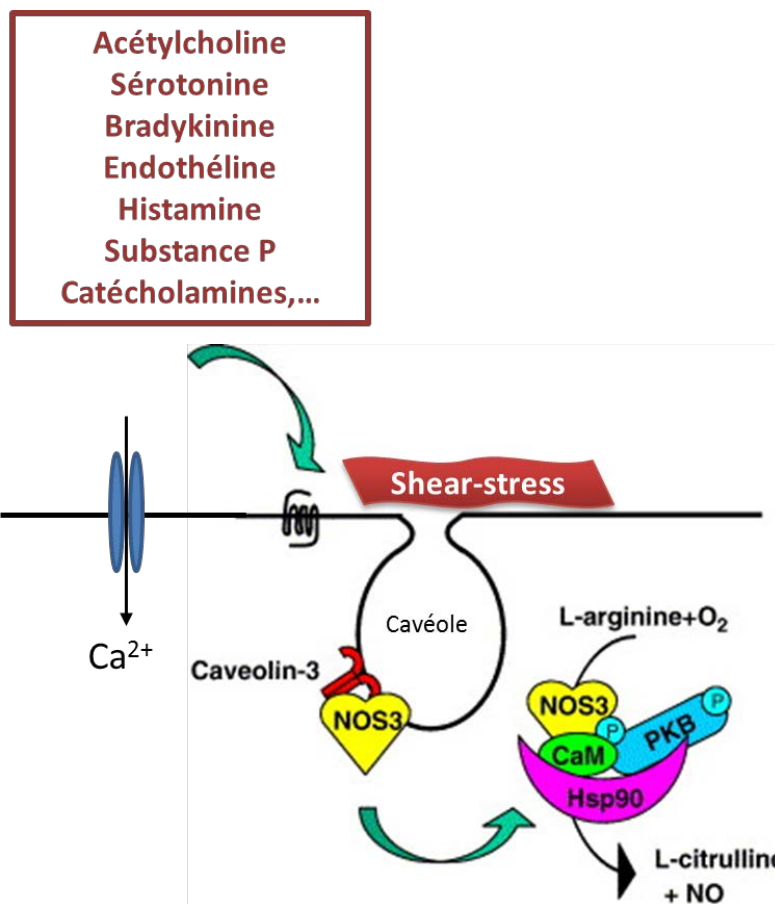


Figure 6 : Mécanismes de régulation de eNOS

La cavéoline inhibe directement eNOS et la maintient inactive, alors que le complexe calcium/calmoduline (CaM) et Hsp90 activent eNOS. La phosphorylation de eNOS est assurée par la protéine kinase B (PKB). *Modifié d'après (46).*

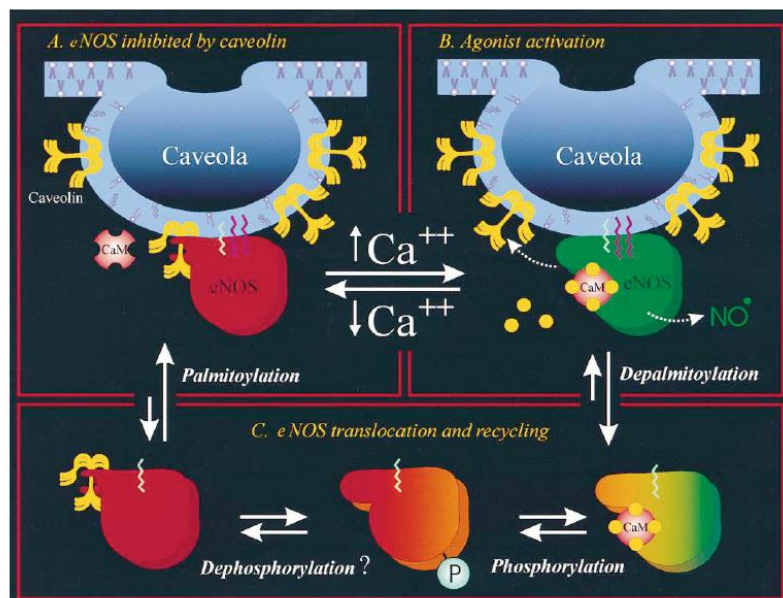


Figure 7 : Cycle d'activation/inactivation de eNOS par des processus de palmitoylation / dépalmitoylation et de phosphorylation / dephosphorylation

CaM : complexe calcium/calmoduline. *D'après (44).*

NO, de l'ordre du nM (46). La NOS inductible est régulée principalement au niveau transcriptionnel et synthétise en général de fortes concentrations de NO, de l'ordre du μM , ce qui permet la neutralisation rapide des agents pathogènes (47).

Si une faible synthèse de NO signale un dysfonctionnement associé à un risque pathologique à long terme, une forte synthèse, comme en situation de stress, s'accompagne d'un stress oxydant délétère pour les tissus, en particulier par la nitration de protéines. Afin de comprendre de quelle manière la synthèse et la biodisponibilité du NO sont régulées au niveau de l'endothélium, nous focaliserons notre exposé sur l'isoforme prédominante retrouvée au niveau de la paroi vasculaire, la eNOS.

2.1.2. Régulation de la synthèse du NO

Modifications post-translationnelles et interactions avec des protéines

Comme indiqué précédemment, la NOS endothéliale est hautement régulée et cette régulation implique de nombreux processus. Des études, *in vitro*, ont montré que l'activation de eNOS était très compartimentée. En effet, au niveau de l'endothélium vasculaire, eNOS est associée, au sein de microdomaines membranaires de type cavéoles, à une protéine inhibitrice, la caveoline-1 qui assure la structure de la cavéole. Dans des conditions basales, eNOS est inactive et reste liée à la membrane plasmique par l'intermédiaire de processus de myristoylation, de palmitoylation, et d'une interaction avec la cavéoline (33, 45, 48). La stimulation d'eNOS par l'action d'agonistes se liant à différents récepteurs membranaires (par exemple, acétylcholine, bradykinine, histamine et thrombine) conduit à une rapide activation de eNOS par dépalmitoylation, liaison du complexe Ca^{2+} /calmoduline, détachement de la cavéoline et libération de la membrane plasmique (33, 45) (Figure 6 et 7). Ainsi, la localisation d'eNOS dans la cavéole permet non seulement son activation, son internalisation mais aussi son inhibition, structurant ainsi la production du NO en un compartiment particulier. Le cholestérol est capable d'induire l'expression de la cavéoline, qui va alors inhiber l'activité de eNOS par la formation du complexe inhibiteur eNOS-cavéoline, et ainsi diminuer la synthèse de NO (49). De plus, les contraintes de cisaillement sont également un important modulateur, voire le principal modulateur, de l'activité de eNOS (50) (Figure 6). L'activité de eNOS peut également être régulée au niveau transcriptionnel : par exemple, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), l'insuline et le facteur de croissance du fibroblaste (β -FGF) augmentent l'expression d'eNOS alors que l'hypoxie et les LDL oxydés la diminuent (33,

51). Enfin, l'état de phosphorylation de eNOS joue aussi un rôle important dans la régulation de son activité : la phosphorylation des résidus sérines 1177, 633, 615 conduit généralement à son activation alors que celle des résidus thréonine 495 et sérine 114 est inhibitrice. Ces régulations de l'activité de eNOS impliquent une cascade de phosphatases et de kinases endothéliales, telles que les protéines kinases PKB/Akt, PKA et PKC, activées notamment par un influx calcique (46, 52) (Figure 7).

Accessibilité du substrat et des cofacteurs

Parallèlement, l'activité catalytique de eNOS est très régulée par la biodisponibilité en son substrat principal, la L-arginine, mais aussi en ses nombreux cofacteurs, particulièrement la BH₄ (53). La L-arginine est l'unique substrat de eNOS, ainsi sa biodisponibilité est donc indispensable à la synthèse du NO. La concentration intracellulaire de L-arginine excède son K_m d'au moins 2 ou 3 fois (54). Cela signifie d'une part, que la concentration de L-arginine ne devrait pas être un facteur qui limite l'activité de eNOS et donc la synthèse de NO et d'autre part, l'activité de la eNOS ne devrait donc pas être sensible aux variations de la concentration extracellulaire d'arginine. Néanmoins, *in vitro* (23) et *in vivo* (24, 25), l'addition/administration de L-arginine augmente la synthèse de NO. Ce « paradoxe de l'arginine » (détaillé de façon plus importante au chapitre C/4) suggère que des facteurs autres que la concentration extracellulaire/circulante en L-arginine influencent la biodisponibilité de la L-arginine pour eNOS (55). Parmi ces possibles facteurs figurent le transport de l'arginine au sein des cellules endothéliales (56) et plusieurs autres processus pouvant moduler la production du NO par une régulation du métabolisme de l'arginine. Par exemple, l'utilisation de la L-arginine par eNOS peut être en compétition avec d'autres voies de catabolisme de la L-arginine, telles que la voie arginase (voir chapitre C/4/4.3) (57, 58). En outre, on sait que la méthylation de l'arginine protéique entraîne, lors de la protéolyse, la formation d'un inhibiteur compétitif endogène d'eNOS, la diméthylarginine asymétrique (ADMA), pouvant induire une diminution de la production de NO (59, 60).

En effet, d'autres régulateurs endogènes de l'activité de eNOS sont les méthylarginines. Ce sont des analogues de la L-arginine chez lesquels le groupement guanidium terminal est méthylé (61). La synthèse du NO est sélectivement inhibée par la N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) et l'ADMA qui entrent en compétition avec la L-arginine au niveau du site catalytique de eNOS. La diméthylarginine « symétrique » (SDMA), le stéréoisomère inactif de l'ADMA, n'inhibe pas directement eNOS mais est capable d'interférer avec la synthèse du

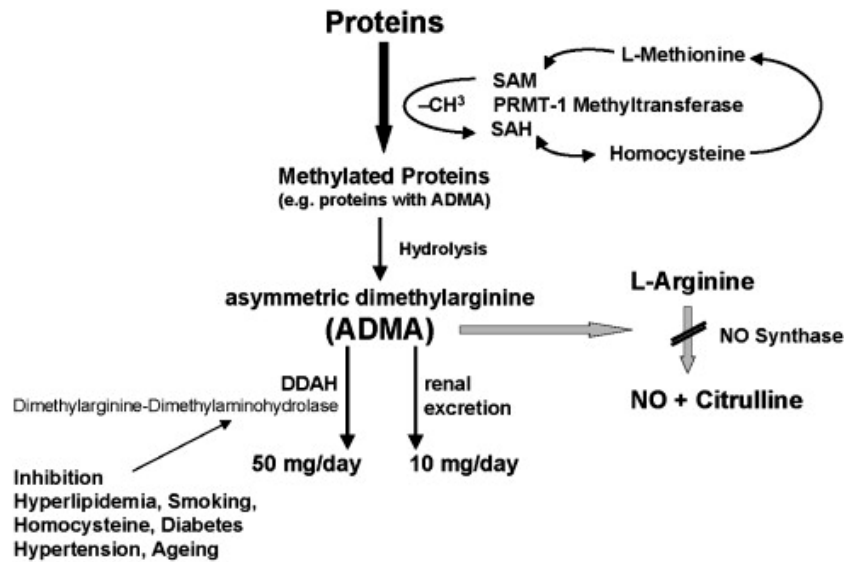


Figure 8 : Schéma simplifié du métabolisme de l'ADMA

La protéine méthyltransférase 1 (PRMT1) méthyle des résidus d'arginine à l'intérieur des protéines en utilisant la S-adenosylméthionine (SAM) comme donneur de méthyle. Après hydrolyse de ces protéines, l'ADMA libre, comme inhibiteur compétitif de la NOS, est présent dans le cytoplasme et dans le plasma sanguin. 20% de l'ADMA environ est éliminé par voie rénale. La voie principale d'excrétion se fait par la DDAH qui catabolise l'ADMA en citrulline et en diméthylamine. SAH, S-adenosylhomocystéine. *D'après (272).*

NO en entrant en compétition avec l'arginine pour le transport transmembranaire via les CAT (cationic amino acid transporters), protéines transmembranaires du système de transport y⁺ (voir chapitre C/4/4.1 pour plus de détails) (61). Dans la mesure où la concentration d'ADMA est environ 10 fois plus élevée que la concentration de L-NMMA, l'ADMA est considérée comme le principal inhibiteur endogène de la synthèse du NO (61). L'ADMA et le L-NMMA sont des produits de la dégradation de protéines cellulaires contenant des résidus arginines méthylés. En effet, à une étape post-traductionnelle de la maturation des protéines intracellulaires, les atomes d'azote des résidus arginine peuvent subir (à partir d'un donneur de groupement méthyle comme la méthionine) une mono- ou une di-méthylation suite à l'action d'une protéine méthyltransferase (PRMT) (Figure 8) (62). Ces protéines méthylées sont principalement retrouvées au niveau nucléaire où elles jouent un rôle dans la maturation de l'ARN et dans le contrôle transcriptionnel (62). L'ADMA est produite par la PRMT de type 1 et la SDMA par la PRMT de type 2. Les deux types de méthyltransferase sont capables de former le L-NMMA (62). Les méthylarginines sont libérées dans le cytosol lorsque les protéines sont hydrolysées; leur existence est donc intimement liée au turn-over protéique (62). La quantité d'ADMA produite dépend donc de la quantité de résidus arginine ayant subi une méthylation au sein des protéines, ainsi que du turn-over de ces protéines. Les reins jouent un rôle important dans l'élimination des diméthylarginines par le biais de l'excrétion urinaire d'ADMA et de SDMA (61, 62). Une autre voie d'élimination de l'ADMA est sa conversion par la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH) en citrulline et diméthylamine. L'enzyme DDAH est largement représentée dans l'organisme humain, plus particulièrement dans le pancréas, la rate, les reins et les cellules endothéliales (61). Il existe 2 types de DDAH : le type 1 est retrouvé dans les tissus exprimant la nNOS, et le type 2 dans les tissus exprimant la eNOS (61). Chez l'Homme, on peut estimer qu'environ 300 µmol d'ADMA sont produites chaque jour, et qu'environ 80% sont métabolisés par la DDAH (61). Il a été montré que l'inhibition de la DDAH entraîne la vasoconstriction d'anneaux artériels, et celle-ci étant annulée par l'adjonction d'arginine, cela indique que la régulation intracellulaire de l'ADMA par la DDAH joue un rôle important dans la régulation de l'activité de eNOS (61, 63). De plus, des souris surexprimant la DDAH humaine présentent une faible concentration plasmatique d'ADMA, ainsi qu'une synthèse augmentée de NO, confirmant le rôle important de l'ADMA endogène dans le contrôle de l'activité de eNOS (61, 64).

Couplage de eNOS

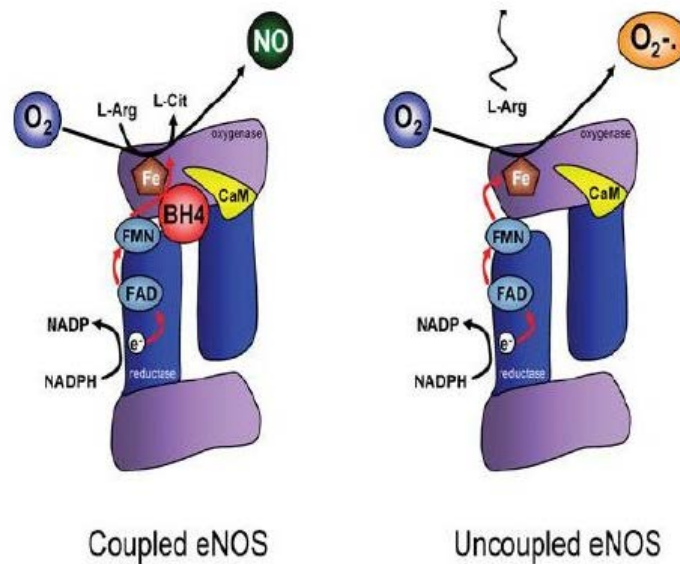


Figure 9 : Couplage/Découplage de eNOS et production d'anions superoxydes

Lorsque l'arginine et la BH₄ sont retrouvées au niveau d'eNOS en quantités suffisantes, le transfert d'électrons du NADPH au groupement hème entraîne la synthèse du NO, l'enzyme est sous sa forme couplée, active. Lorsque l'arginine ou la BH₄ sont retrouvées en quantités limitantes, le transfert d'électrons favorise plutôt la réduction de l'oxygène en anions superoxydes. *D'après (53).*

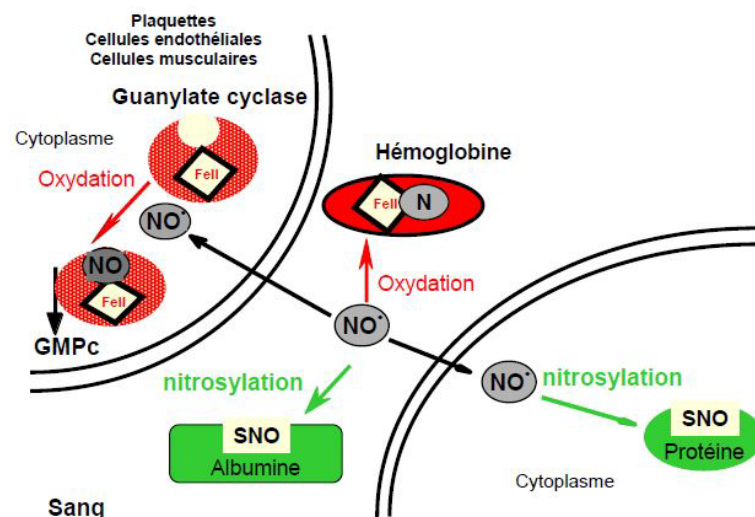


Figure 10 : Régulation de la biodisponibilité du NO au niveau systémique *D'après (315).*

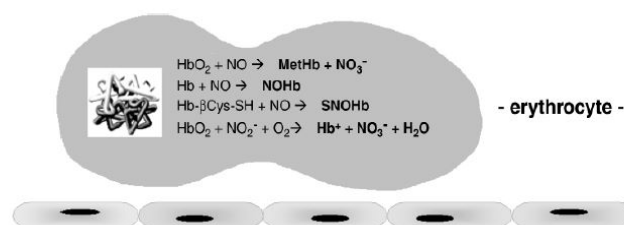


Figure 11 : Réactions impliquant le NO au niveau des érythrocytes

Le NO peut être oxydé soit par l'oxyhémoglobine (HbO₂) et conduit à la synthèse de méthémoglobine (MetHb) et d'ions nitrates, soit par la deoxyhémoglobine et entraîne la production de nitrosylhémoglobine (NOHb). L'interaction entre le NO et le résidu Cystéine 93 du groupement hème de l'hémoglobine entraîne la synthèse de S-nitrosohémoglobine (SNOHb). Les ions nitrites (NO₂⁻) plasmatiques peuvent être rapidement capturés par les érythrocytes et être oxydés en ions nitrates (NO₃⁻) de façon hémoglobine-dépendante. *D'après (393).*

La dimérisation et le couplage d'eNOS constituent un dernier, mais non des moindres, processus de régulation de la synthèse de NO. Les NOS résultent de l'assemblage de 2 monomères composés d'un domaine réductase C-terminal et d'un domaine oxygénase N-terminal (45). Isolés, ces monomères sont incapables de lier la L-arginine et le cofacteur principal BH₄. L'enzyme n'est donc activable et fonctionnelle que sous sa forme homodimérique (65). La dimérisation de la NOS nécessite la présence d'un hème qui se fixe au domaine oxygénase et qui permet le rapprochement et l'interaction des deux sous-unités oxygénases. Si l'apport en BH₄ et en L-arginine est suffisant, les deux sous-unités oxygénases de l'enzyme fonctionnent ensemble et produisent du NO à partir de l'arginine, grâce au flux d'électrons. L'enzyme est alors sous sa forme couplée (45, 65). En revanche, en absence de BH₄ et/ou d'un apport insuffisant en L-arginine, les deux sous-unités oxygénases de l'eNOS fonctionnent indépendamment et produisent simultanément du NO et des anions superoxydes (O₂⁻). Ces deux entités réagissent ensemble pour former un puissant oxydant, le peroxynitrite. L'enzyme est alors sous sa forme découplée (65) (Figure 9). Le découplage de eNOS est un phénomène auto-entraînant car une plus grande production de O₂⁻ favorise, entre autres, l'oxydation de la BH₄, l'augmentation des concentrations en ADMA et la dissociation de eNOS des cavéoles (66, 67).

2.1.3. Régulation de la biodisponibilité du NO

Dès sa synthèse, le NO diffuse sous forme gazeuse. Synthèse et libération sont simultanées et il n'y a pas de stockage de NO dans les tissus. L'activité biologique et la biodisponibilité du NO sont ainsi fortement régulées (Figure 10). La biodisponibilité du NO résulte d'un équilibre dynamique entre sa synthèse et son inactivation. Dans le sang, le NO est rapidement oxydé en plusieurs métabolites (68, 69). Le NO réagit avec le fer des noyaux hèmes, avec les dérivés de l'oxygène et avec les groupements thiols. Dans le plasma, le principal produit d'oxydation du NO est l'ion nitrite (NO₂⁻), qui peut être immédiatement capté par les érythrocytes, et oxydé en ion nitrate (NO₃⁻), qui est alors redistribué au plasma. En effet, le NO interagit majoritairement avec l'hémoglobine et forme des ions nitrates. L'hémoglobine peut être considérée comme le régulateur principal de la biodisponibilité et du transport du NO (70) (Figure 11). Le NO, au contact des anions superoxydes forment des peroxynitrites (ONOO⁻). A fortes concentrations, les peroxynitrites plasmatiques en excès sont protonés et peuvent être, soit transformés en nitrates, soit décomposés en radical hydroxyle et en radical dioxyde d'azote. Ainsi, la modification ou nitration de résidus tyrosine protéiques ou libres par une attaque au dioxyde d'azote entraîne la formation de la 3-

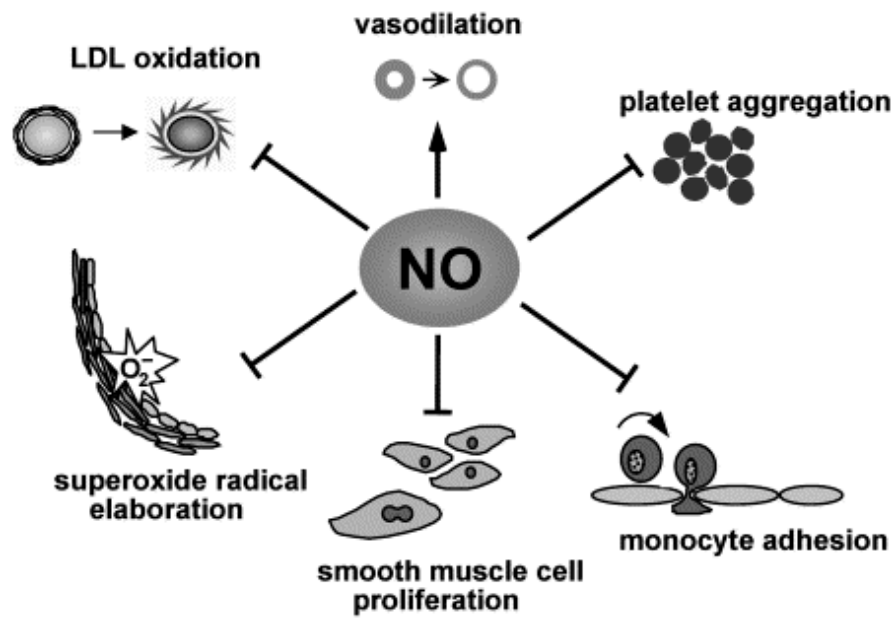


Figure 12 : Le NO, molécule clé de l'homéostasie vasculaire

D'après (1).

nitrotyrosine, considérée comme un produit terminal stable des peroxynitrites (71, 72). De récentes études ont montré que les nitrites et les nitrates étaient, notamment sous certaines conditions d'hypoxie, réduits en NO par certaines enzymes dont la xanthine oxydoréductase qui catalyse la réduction des nitrites en NO (2). Enfin dans le plasma, comme au niveau des érythrocytes, le NO peut réagir directement ou par l'intermédiaire de la formation de peroxynitrites avec des groupements thiols et des groupements amines, formant ainsi des S-nitrosothiols (RSNO) qui peuvent agir comme donneurs de NO et ainsi augmenter substantiellement la demi-vie du NO, et des S-nitrosamines (RNNO) (73, 74).

2.2. Mécanisme d'action du NO au niveau vasculaire et implication dans la fonction endothéliale

2.2.1. Rôle du NO dans la fonction endothéliale

Pour comprendre quel rôle joue le NO au sein de la dysfonction endothéliale, il est nécessaire de comprendre ses nombreux rôles dans l'homéostasie vasculaire. Dans le système cardiovasculaire, le NO conduit les effets protecteurs de l'endothélium, agissant comme un vasodilatateur et une molécule endogène antiathérogène, antiproliférative et anti-thrombotique (75). Le NO joue un rôle essentiel dans le maintien du tonus vasodilatateur au niveau des cellules musculaires lisses. Cette activité vasodilatatrice participe à la régulation de la pression artérielle. Au niveau de la lumière vasculaire, le NO contribue au maintien de la fluidité du sang et à l'inhibition de l'adhésion des plaquettes sanguines et des leucocytes aux cellules endothéliales. De plus, il prévient et facilite la dissolution d'agrégats plaquettaires (76) (Figure 12). Le NO peut également affecter l'activité du système fibrinolytique en régulant la libération du t-PA et de PAI-1, mais aussi inhiber l'expression de divers gènes pro-athérosclérotiques comme la protéine chimioattractante des monocytes (MCP-1) et le facteur tissulaire. De par ces effets, le NO est considéré comme une molécule signal cytoprotectrice jouant un rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire, et donc fortement impliquée dans la fonction endothéliale (77).

2.2.2. Mécanisme d'action du NO

Une fois formé, le NO exerce son activité biologique par de nombreux mécanismes, sur les protéines au sein du cytoplasme, au niveau du noyau ou en diffusant vers les tissus adjacents (cellules musculaires lisses) et les éléments circulants (par ex. les plaquettes). Le NO module l'activité de nombreuses enzymes, souvent par nitrosylation directe (1), comme c'est le cas avec la guanylate cyclase, principale cible du NO. Ainsi le NO diffuse, d'une part,

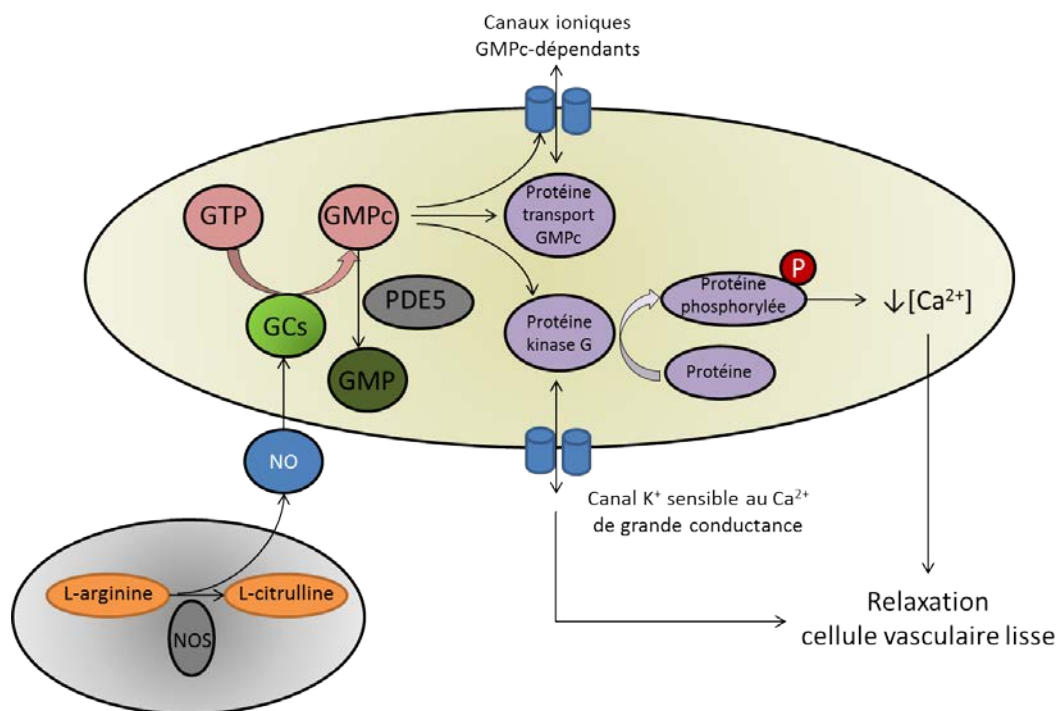


Figure 13 : Voie et mode d'action direct du NO

Le principal médiateur de la voie GMPC est la protéine kinase GMPC dépendante (PKG) qui est responsable de la diminution du Ca^{2+} intracellulaire par l'intermédiaire de la phosphorylation de diverses protéines. Les PKG sont également responsables d'une activation des canaux potassiques sensibles au calcium provoquant une hyperpolarisation inhibant l'entrée des ions calcium par l'intermédiaire des canaux calciques voltage dépendants. Tous ces mécanismes participent à la baisse de Ca^{2+} intracellulaire et vont conduire à la relaxation. Le GMPC peut aussi se lier aux phosphodiésterases (PDE) qui catalysent la conversion de l'adénosine monophosphate cyclique et du GMPC en, respectivement, 5'-AMP et 5'-GMP. La PDE 5 est spécifique du GMPC. *D'après (394).*

vers la lumière vasculaire où il exerce un rôle antiagrégant et anti-adhésif sur les plaquettes et les leucocytes circulants et d'autre part, vers le pôle basal de l'endothélium où il provoque une relaxation des cellules musculaires lisses en augmentant le taux intracellulaire de guanosine 3,5-monophosphate cyclique (GMPc) (45). En effet le principal mécanisme d'action du NO produit par l'endothélium est l'activation de la guanylate cyclase des cellules cibles, et le GMPc formé agit comme un second messenger sur des kinases, des phosphodiesterases et des canaux ioniques (45) (Figure 13). Le NO inhibe l'adhésion des leucocytes, en partie en diminuant l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) (34). Il inhibe l'agrégation et l'adhésion plaquettaire par l'intermédiaire de plusieurs voies. Par exemple, le GMPc et la prostacycline du système vasculaire agissent ensemble pour diminuer l'agrégation plaquettaire, par l'augmentation des concentrations plaquettaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (78). Enfin, les RSNO formés à partir du NO peuvent eux-mêmes participer à la vasodilatation, inhiber l'agrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire (1).

3. Dysfonction endothéliale : caractérisation, mécanismes impliqués et conséquences potentielles sur la fonction vasculaire

La dysfonction endothéliale joue un rôle clé dans le développement d'une large variété de maladies cardiovasculaires. Elle survient lorsque la synthèse/biodisponibilité du NO diminue, ce qui entraîne des effets délétères non seulement sur le processus de vasodilatation mais également sur l'adhésion leucocytaire et l'agrégation plaquettaire, de même que sur la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima vasculaire. Elle correspond ainsi à l'expression d'un phénotype pro-athérogène au niveau de l'endothélium vasculaire et elle signe l'initiation de l'athérosclérose (4, 7, 8). A ce titre, de nombreuses données montrent que les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires ou de diabète, responsables d'une diminution de la disponibilité du NO, conduisent à une dysfonction endothéliale (3, 7, 8, 11, 19, 79).

3.1. Phénotype pro-athérogène et activation endothéliale

Une perturbation de l'homéostasie de l'endothélium vasculaire est à l'origine de la dysfonction endothéliale, qui se caractérise notamment par une altération de la réactivité vasculaire ainsi qu'un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique de l'endothélium (80, 81). Ce dysfonctionnement, en partie causé par une diminution de la biodisponibilité du NO, est aggravé par la présence de facteurs de risque cardiovasculaire (80, 81). La diminution du NO est à l'origine de nombreux événements pathogéniques au niveau de l'endothélium

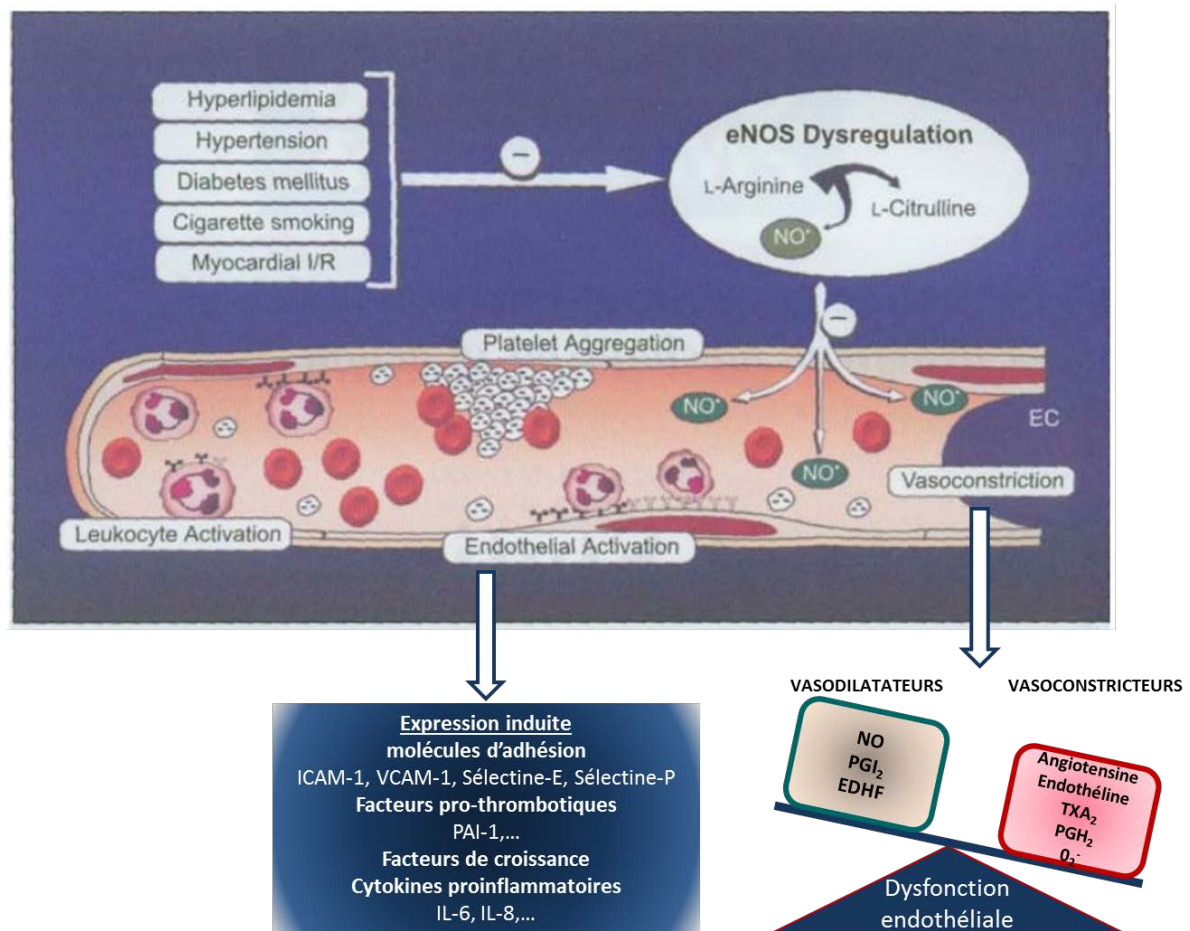


Figure 14: Dysfonction endothéliale : phénotype pro-athérogène et activation endothéliale

La dysfonction endothéliale est caractérisée principalement par une altération de la réactivité vasculaire NO-dépendante, associée à un état pro-inflammatoire. Ces dérégulations physiologiques et métaboliques vasculaires prédisposent la paroi vasculaire à une activation endothéliale définie par une activation des voies de signalisation de l'adhésion leucocytaires. *Modifié d'après (395).*

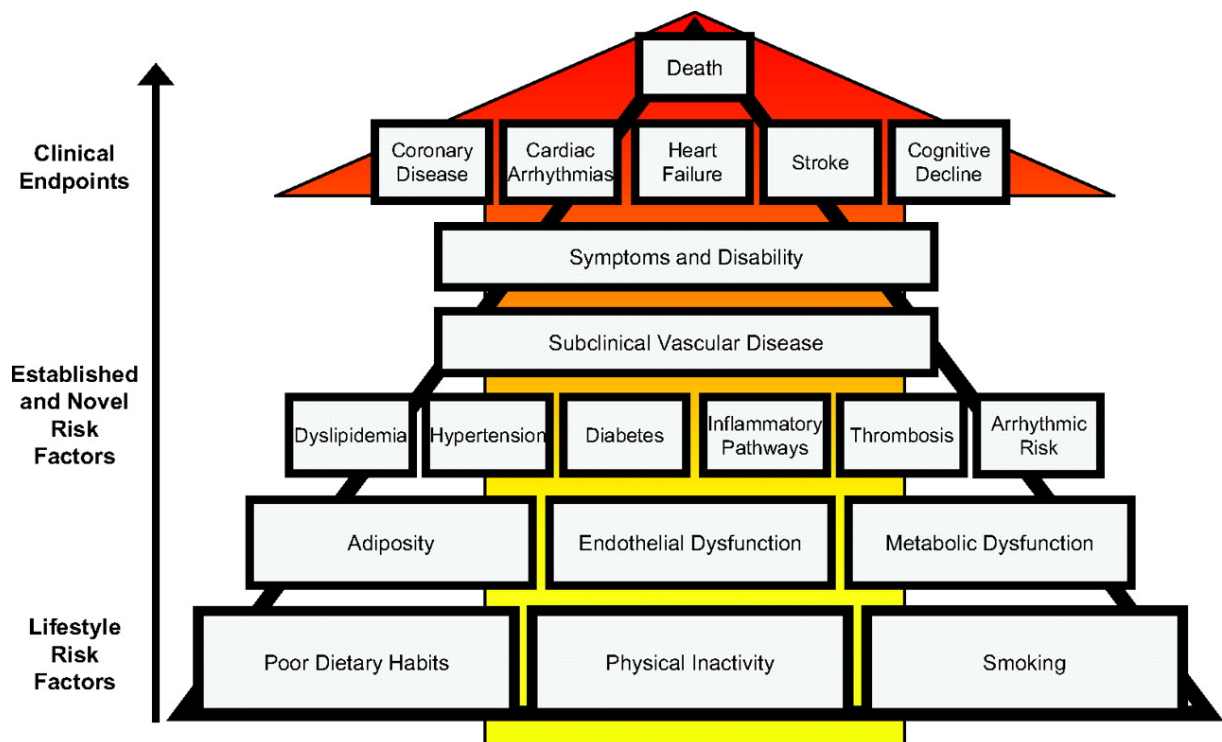


Figure 15 : Relations entre le style de vie, les facteurs de risque cardiovasculaires et les maladies cardiovasculaires : rôle précoce de la dysfonction endothéliale

Les facteurs de risque cardiovasculaire sont fortement influencés par le style de vie, par l'intermédiaire des effets sur d'autres nouveaux facteurs de risque tels que la dysfonction endothéliale, l'inflammation et le stress oxydant. D'après (85).

incluant entre autres, une activation plaquettaire, une activation leucocytaire, une vasoconstriction et une activation endothéliale (80, 81) (Figure 14). Ainsi, lorsque cette dysfonction endothéliale existe on observe :

- une vasoconstriction, qui en dehors de la diminution du NO peut aussi en être due à la production exagérée de facteurs vasoconstricteurs tels que l'ET-1 et l'angiotensine II (80);
 - une activation endothéliale qui se traduit par la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par l'endothélium (82), favorisant la rupture de la barrière endothéliale, mais aussi par l'expression de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire telles que VCAM-1 ou ICAM-1 à la surface de l'endothélium, participant à la réaction inflammatoire en favorisant l'adhésion puis la pénétration dans l'espace sous-intimal de cellules inflammatoires comme les monocytes (83).
 - une activation plaquettaire et une coagulation imparfaite favorisant les thromboses (35);
- Ainsi, la dysfonction endothéliale est considérée comme l'étape la plus précoce de l'athérogenèse, participant à l'initiation et au développement de la plaque athéromateuse et précédant les premières manifestations cliniques athérothrombotiques (22, 84).

3.2. Facteurs de risque cardiovasculaire et dysfonction endothéliale

Comme mentionné précédemment, tous les facteurs de risque cardiovasculaire connus ont été associés à un ou plusieurs paramètres de dysfonction endothéliale (80, 81). Si l'âge, l'hypertension artérielle, le diabète de type 2, les dyslipidémies et le tabagisme ont été clairement identifiés comme des facteurs de risque cardiovasculaire majeurs, il est maintenant établi que l'obésité androïde, la sédentarité et des déséquilibres alimentaires sont des facteurs de risque cardiovasculaire prédisposant (85) (Figure 15). D'autres facteurs tels que l'hyperhomocystéinémie (Figure 16), l'augmentation des concentrations plasmatiques de marqueurs pro-inflammatoires (inflammation à bas bruit) et pro-thrombotiques sembleraient constituer de nouveaux facteurs de risque cardiovasculaire ou critères associés à une augmentation de risque cardiovasculaire (86, 87) Les facteurs de risque cardiovasculaire conduisent à des changements moléculaires et biochimiques dans l'environnement vasculaire, qui peuvent moduler la bioactivité du NO. Les principaux facteurs de risque cardiovasculaire sont tous associés à une relaxation endothélium-dépendante altérée (13) et par exemple, des diminutions de la synthèse de NO ont été montrées dans des situations d'hypertension, de diabète de type 2 et d'hypercholestérolémie (15, 88, 89).

L'inflammation à bas bruit est une réponse inflammatoire graduée, de faible intensité, qui correspond à une situation intermédiaire entre l'état basal et une réponse inflammatoire

classique. Elle peut être induite par un certain nombre de stimuli métaboliques, comme par exemple les acides gras libres (90), impliqués dans la physiopathologie du syndrome métabolique (91). En fonction de la réponse inflammatoire induite, l'endothélium est capable d'adapter progressivement une synthèse et une sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et/ou anti-inflammatoires, de facteurs vasodilatateurs et/ou vasoconstricteurs, de molécules matricielles, de facteurs pro-coagulants et anti-thrombotiques, et de facteurs de croissance (92). Cependant lorsque les stimuli inflammatoires ou métaboliques perdurent ou sont imposés de façon répétée, comme par exemple lors du développement de l'obésité ou du diabète de type 2, on observe une inflammation à bas bruit chronique qui contribue à la dysfonction endothéliale et à la progression du processus athérosclérotique (93).

Enfin, le stress oxydant joue également un rôle dans la dysfonction endothéliale et le développement des maladies cardiovasculaires (94). En effet les différents facteurs de risque cardiovasculaire (tabagisme, hypertension artérielle, obésité, excès de cholestérol...) provoquent la synthèse de ROS par les cellules endothéliales, par les monocytes et les macrophages circulants (95).

3.3. Implication du NO dans la dysfonction endothéliale

De nombreuses études ont suggéré qu'une altération de la biodisponibilité du NO était le mécanisme principal impliqué dans la dysfonction endothéliale (4, 12, 13, 96, 97). Ainsi, une importante partie des études des mécanismes de la dysfonction endothéliale s'est attachée à évaluer les mécanismes à l'origine de la baisse de la biodisponibilité du NO. De façon générale, une telle baisse de la biodisponibilité peut résulter d'une diminution de sa synthèse ou d'une augmentation de sa dégradation (en particulier par les ROS) (12) (Figure 17).

3.3.1. Diminution de la synthèse du NO

Compte tenu des mécanismes connus conduisant à la synthèse de NO, une baisse de la synthèse de ce facteur peut résulter, entre autres :

- d'une déficience en L-arginine, substrat de la eNOS. En effet, Wu *et al.*, ont reporté une diminution de la synthèse de NO chez des rats, mesurée par l'excrétion urinaire de NO_3^- , après une restriction de la prise en L-arginine (12). A titre d'illustration, il a été constaté qu'une supplémentation en arginine pouvait moduler de nombreuses fonctions associées au NO (22-24, 98);
- de la présence en concentrations augmentées d'inhibiteurs endogènes de la eNOS comme l'ADMA. Il a été observé que l'ADMA inhibait de façon compétitive la synthèse de

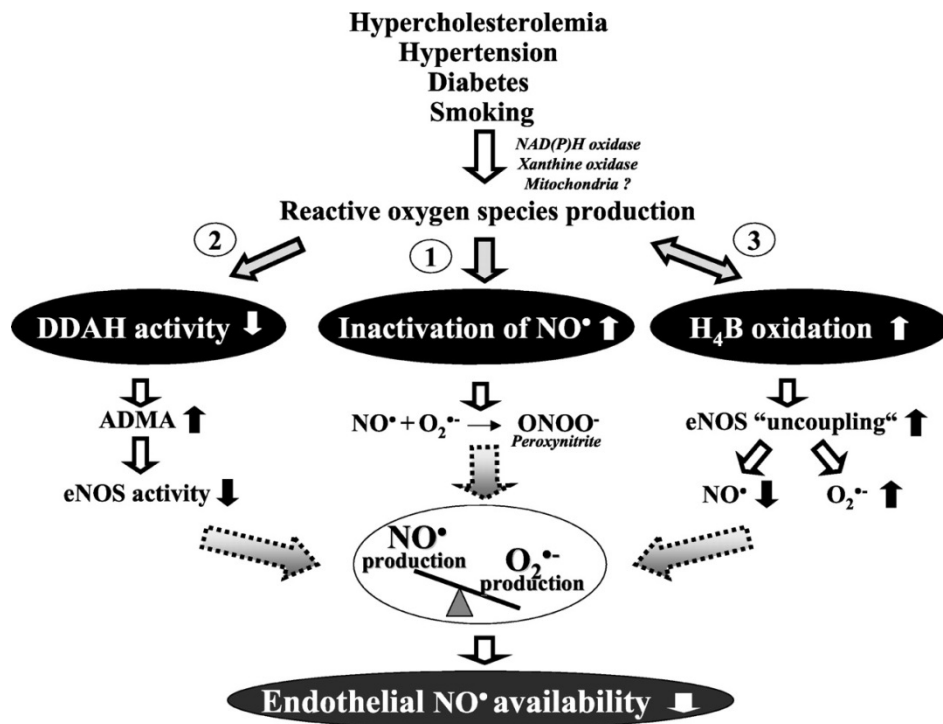


Figure 18 : Facteurs de risque cardiovasculaires, stress oxydant et biodisponibilité en NO

Les facteurs de risque cardiovasculaire augmentent la production de ROS qui peuvent réduire la biodisponibilité du NO par l'intermédiaire d'au moins 3 voies : l'inactivation directe du NO par les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) conduisant à une perte de bioactivité du NO; l'activité réduite de la NO synthase due à une augmentation des concentrations d'ADMA, induite par une inhibition de la diméthyl-aminohydrolase (DDAH); et le découplage de eNOS due à une augmentation de l'oxydation du BH_4 . D'après (397).

nitrites urinaires (25) et conduisait à une diminution de la vasodilatation NO-dépendante de l'endothélium chez des individus hypercholestérolémiques (12, 99);

- d'une déficience en cofacteurs de la eNOS, en particulier la BH₄. Une étude a montré que l'inhibition de la synthèse de BH₄ dans les artères coronaires conduisait à une diminution d'activité du NO, à une augmentation de la production de ROS et à un dysfonctionnement vasculaire; et Stroes *et al.*, ont observé une amélioration de la fonction endothéliale avec une infusion de BH₄ chez des patients hypercholestérolémiques (12, 100);

- d'une diminution de l'expression de la eNOS qui peut être due à une transcription réduite du gène ou à une diminution de la demi-vie de l'ARNm;

- d'une altération des voies de transduction du signal conduisant à l'activation de eNOS.

3.3.2. Augmentation de la dégradation de NO

Comme vu précédemment, la biodisponibilité du NO résulte d'un équilibre dynamique entre sa synthèse et son inactivation, et l'inactivation du NO implique des processus de liaison mais surtout de dégradation. La diminution de la biodisponibilité du NO est essentiellement due à une augmentation du stress oxydant (avec une augmentation de l'activité des radicaux libres), comme c'est le cas en présence de maladies cardiovasculaires ou de facteurs de risque cardiovasculaire (101) (Figure 18). Les ROS tels que les superoxydes et le peroxyde d'hydrogène interagissent avec le NO, ce qui non seulement réduit sa demi-vie mais conduit à la production de peroxynitrites très réactifs. Toutes ces espèces réactives peuvent modifier de façon covalente eNOS et diminuer son activité (12). Les sources de ces radicaux libres incluent la xanthine oxydase, la NADPH oxydase et eNOS elle-même (sous sa forme découplée) (12). De nombreuses études ont observé une augmentation de la production de ROS au niveau des artères prélevées sur des animaux hypercholestérolémiques ou atteints de pathologies cardiovasculaires, en comparaison à des animaux sains (102-104). En outre, des études d'intervention ont montré que l'administration de la superoxyde dismutase (SOD) ou de vitamines antioxydantes, réduisait l'altération de la vasodilatation NO-dépendante observée chez des animaux atteints de pathologies athérosclérotiques (104). Ainsi, le stress oxydant est considéré comme le phénomène clé impliqué dans la diminution de la biodisponibilité du NO. .

Tableau 1 : Définitions du syndrome métabolique

Critères	OMS	NCEP	EGIR	IDF	AHA/NHLBI	Définition unifiée
Insulinémie à jeun	> quartile supérieur	Non	> quartile supérieur	Non	Non	Non
Adiposité abdominale	T/H > 0,90 H T/H > 0,85 F	TT > 102 cm H TT > 88 cm F	TT ≥ 94 cm H TT ≥ 80 m F	TT ≥ 94 cm H TT ≥ 80 m F	TT > 102 cm H TT > 88 cm F	Dépendante des populations et des pays
Obésité	IMC > 30 kg/m²	Non	Non	Non	Non	Non
Pression artérielle	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg
Glycémie à jeun	≥ 110 mg/dL	≥ 110 mg/dL	≥ 110 mg/dL	≥ 100 mg/dL ou traitement	≥ 100 mg/dL ou traitement	≥ 100 mg/dL ou traitement
Triglycéridémie	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 180 mg/dL	≥ 150 mg/dL ou traitement	≥ 150 mg/dL ou traitement	≥ 150 mg/dL ou traitement
Cholestérol-HDLémie	< 35 mg/dL H < 40 mg/dL F	< 40 mg/dL H < 50 mg/dL F	< 40 mg/dL H < 40 mg/dL F	< 40 mg/dL H < 50 mg/dL F ou traitement	< 40 mg/dL H < 50 mg/dL F ou traitement	< 40 mg/dL H < 50 mg/dL F ou traitement
Microalbuminurie	Oui	Non	Non	Non	Non	Non

AHA/NHLBI : American heart association and National Heart, Lung, and Blood Institute, EGIR : European Group for the Study of Insulin Resistance, IDF : Fédération International du Diabète, NCEP : National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel (ATP) III, OMS : Organisation Mondiale de la Santé, F : femme, H : homme, T/H : ratio taille/hanche, TT : tour de taille.

B. Importance de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie du syndrome métabolique

1. Définitions du syndrome métabolique et prévalence

Le syndrome métabolique est un problème de santé publique majeur, s'accroissant dans le monde entier. Il désigne une constellation de facteurs de risque cardiométabolique étroitement liés à la progression du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose (105).

Le terme de syndrome métabolique n'est devenu largement utilisé que depuis son introduction en 2001 par le « National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III » (NCEP/ATP III) (106). Le concept de syndrome a été évoqué pour la première fois en 1923 par Kylin, qui a démontré l'association de l'hypertension, de l'hyperglycémie et de la goutte. Les éléments de base du syndrome métabolique ont ensuite été décrits dans les années 1940 par Vague, qui a déclaré que l'obésité viscérale était communément associée aux anomalies métaboliques trouvées dans les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2. En 1988, Reaven désigne sous l'appellation du syndrome X, l'association de l'intolérance au glucose, de la résistance à l'insuline/hyperinsulinémie, de l'obésité centrale, de la dyslipidémie et de l'hypertension artérielle; et propose que l'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie soient les causes sous-jacentes de ces anomalies. Il suggère que ces anomalies coexistent chez un individu de façon non aléatoire et qu'elles sont impliquées dans l'initiation et la progression des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2 (107). Depuis, différentes définitions ont été proposées par différentes organisations. Après une démarche initiale de l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 1999, visant à définir le syndrome métabolique selon une approche physiopathologique qui reposait sur l'évaluation de marqueurs de résistance à l'insuline, le NCEP/ATP III en 2001, puis la Fédération International du Diabète (IDF) en 2005 ont proposé une approche plus clinique ayant pour objectif de fournir des critères aisément utilisables en pratique, afin de faciliter le diagnostic du syndrome métabolique et donc les patients à risque de développer un diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (Tableau 1). Un consensus a alors été proposé en 2009 par de nombreuses organisations scientifiques internationales, considérant le syndrome métabolique comme un problème complexe multifactoriel de santé, incluant une insulino-résistance/hyperinsulinémie, des troubles de tolérance au glucose, de l'hypertension artérielle, une dyslipidémie caractérisée par une élévation des triglycérides et un taux bas de cholestérol-HDL, et une obésité abdominale évaluée par le tour de taille. Després a notamment introduit la notion de « tour de

taille hypertriglycéridémique » afin de dépister l'obésité viscérale associé à une anomalie importante, l'élévation de la triglycéridémie (108). La définition de l'IDF/AHA/NHLBI (American Heart Association, National Heart, Lung and Blood Institute) est née de la volonté de fournir une définition unique utilisable partout dans le monde, où les seuils utilisés pour le tour de taille sont spécifiques au pays et à l'origine ethnique. Ainsi la définition « clinique » du syndrome métabolique chez le sujet sain implique la présence de 3 facteurs de risque cardiovasculaire sur les 5 suivants : excès de tour de taille, élévation de la triglycéridémie, faible HDL-cholestérolémie, élévation de la pression artérielle, élévation de la glycémie, ou présence alternativement de traitement médicamenteux pour réduire ces facteurs de risque (109, 110).

La prévalence du syndrome métabolique dépend de sa définition, de l'année de l'étude, de l'âge, du sexe, de l'ethnie de la population, ce qui complique les analyses entre pays et entre continents (111). Il n'existe donc pas de chiffres mondiaux de prévalence pour le syndrome métabolique. Néanmoins, indépendamment des différences de définitions et de critères, il est à ce jour clairement établi que la prévalence du syndrome métabolique s'accroît dans le monde. Cette augmentation constante est étroitement liée à la progression de l'obésité, posant ainsi de sérieux problèmes de santé publique. La prévalence du syndrome métabolique (selon les critères NCEP-ATP III, 2001) varierait de 8% à 43% chez les hommes et de 7% à 56% chez les femmes partout dans le monde (111). Aux Etats-Unis, le syndrome métabolique concerne globalement 25 à 30 % de la population adulte (112). En France, quelques données sont disponibles, notamment au travers de l'étude DESIR, avec une prévalence estimée à 16 % pour les hommes et 11 % pour les femmes (113).

2. La dysfonction endothéliale associée au syndrome métabolique : un rôle physiopathologique de premier plan

2.1. Physiopathologie du syndrome métabolique

L'étiologie du syndrome métabolique est complexe et multifactorielle. Bien que la littérature scientifique sur le sujet soit abondante et croissante, il n'y a actuellement pas d'arguments décisifs en faveur d'une cause unique responsable de l'ensemble des anomalies. La nature exacte des interactions entre les diverses composantes du syndrome métabolique, ainsi que leur ordre d'importance et d'apparition, demeurent mal compris (114). L'état actuel des connaissances suggère néanmoins que l'obésité viscérale abdominale (115), la résistance à l'insuline (107) et une inflammation chronique à bas bruit sont les principaux processus

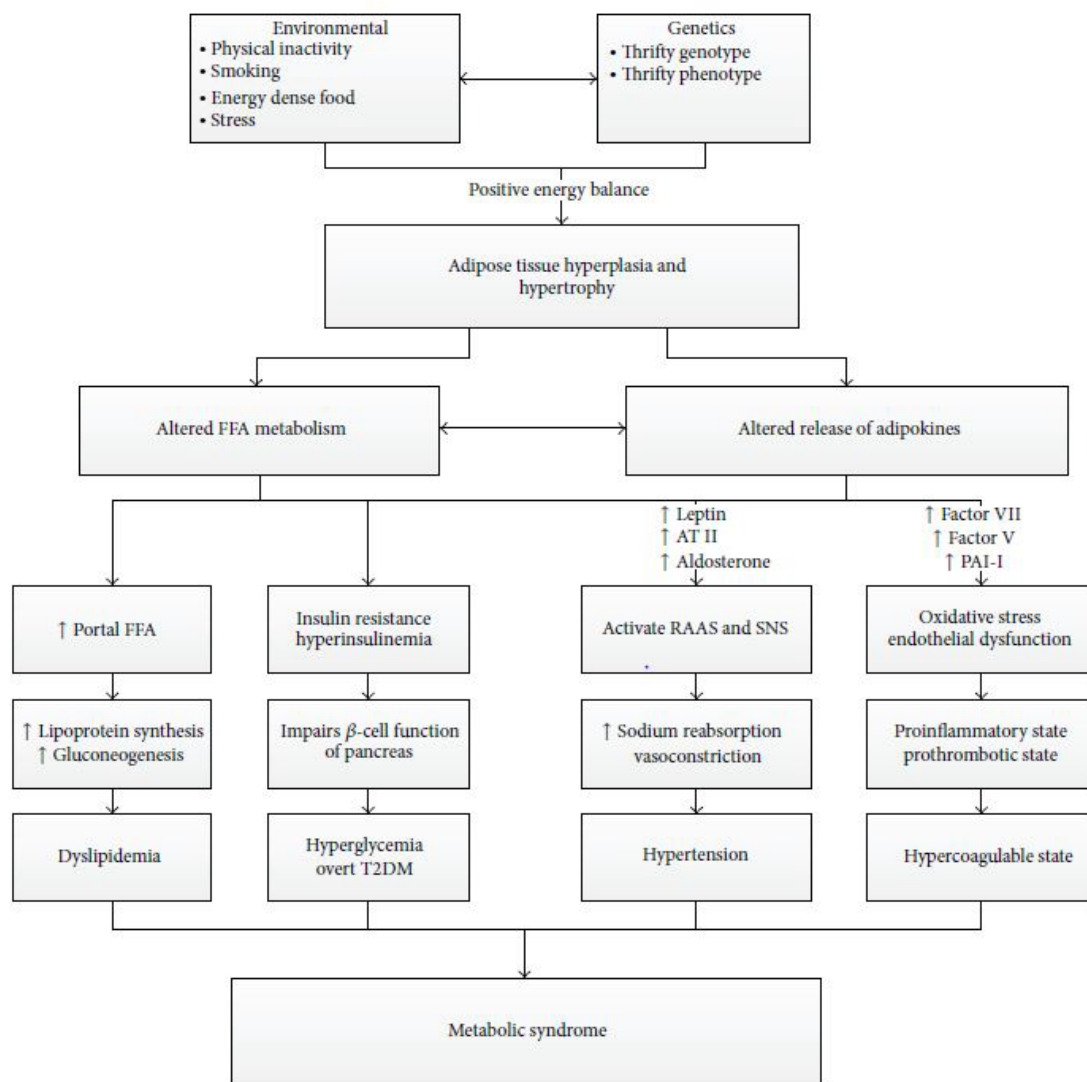


Figure 19 : Représentation schématique de la physiopathologie du syndrome métabolique

ATII : angiotensin II, FFA : free fatty acids, RAAS : renin angiotensin aldosterone system, SNS, sympathetic nervous system. *D'après (91).*

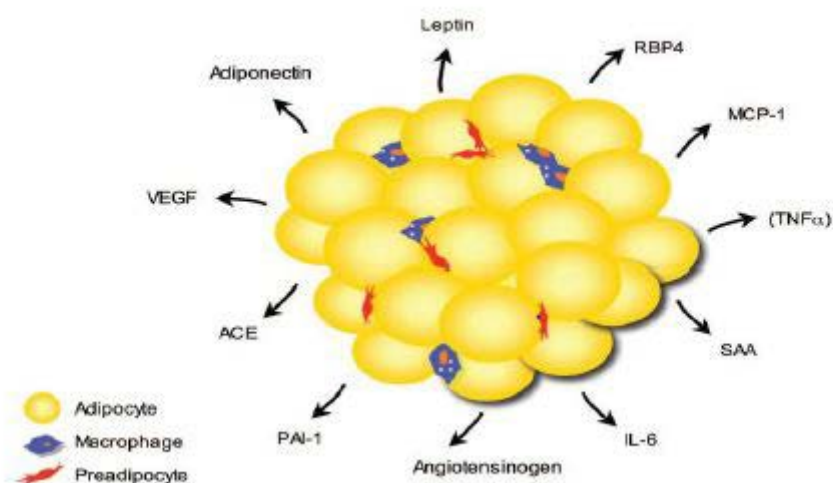


Figure 20 : Le tissu adipeux, un organe endocrine

Quelques exemples des nombreuses adipokines synthétisées et/ou sécrétées par le tissu adipeux (SAA : serum amyloid A, RBP4 : Retinol binding protein 4, ACE : angiotensinogen converting enzyme). *D'après (398).*

susceptibles d'expliquer le développement des différentes anomalies observées chez les individus atteints du syndrome métabolique. Cependant, les mécanismes ne sont pas encore clairement élucidés. Actuellement, de plus en plus d'études suggèrent qu'une dysfonction du tissu adipeux jouerait un rôle important dans le développement des diverses composantes du syndrome métabolique (116, 117). L'hypothèse la plus universellement acceptée est le développement d'une insulino-résistance dans les tissus sensibles tels que le foie et le muscle, en raison de l'excès d'acides gras libres circulants provoqué par l'obésité.

Des données indiquent que le syndrome métabolique est précédé par un excès de tissu adipeux viscéral (115), associé à un état pro-inflammatoire (118) et à des troubles du métabolisme lipidique. L'altération du métabolisme des acides gras libres constitue un mécanisme important à l'origine de l'insulino-résistance qui s'accompagne d'une hyperinsulinémie compensatrice. Les adipocytes intra-abdominaux hypertrophiés sont caractérisés par un état hyperlipolytique qui entraîne une résistance à l'effet anti-lipolytique de l'insuline. Ils sont ainsi le siège d'une lipolyse accrue conduisant à une augmentation des concentrations plasmatiques d'acides gras libres circulants (119, 120). L'élévation du flux d'acides gras libres entraîne une diminution du transport du glucose vers les tissus périphériques comme le muscle et le tissu adipeux, une diminution de son stockage au niveau hépatique, une altération de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse hépatique, ce qui entraîne une hyperglycémie (figure 19) (91, 119, 121).

L'élévation des acides gras libres conduit à une stabilisation de la production de l'apolipoprotéine B, la lipoprotéine majeure des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Ceci résulte en une augmentation de la production de VLDL, qui sont riches en triglycérides et donc à une hypertriglycéridémie (figure 19). La dyslipidémie observée lors du syndrome métabolique se traduit aussi par une diminution de la concentration en HDL-cholestérol et une augmentation de celle en LDL-cholestérol athérogène (91, 122).

Au-delà de son rôle dans le stockage des lipides, le tissu adipeux est un organe endocrine et paracrine produisant de nombreuses molécules regroupées sous le terme d'adipokines (figure 20). Ces molécules sont impliquées localement ou de manière endocrine dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques, dont la réponse immune et inflammatoire, et la régulation de la balance énergétique. Les adipokines ont un rôle d'interface entre l'obésité et les événements moléculaires qui conduisent à la résistance à l'insuline, l'inflammation, la dyslipidémie, l'hypercoagulabilité et les anomalies endothéliales associées à l'athérosclérose et au syndrome métabolique (123). Les mécanismes qui

conduisent à l'activation de l'inflammation dans le tissu adipeux ne sont que partiellement compris. L'accumulation d'acides gras libres dans les adipocytes viscéraux pourrait initier le processus en induisant un état de stress cellulaire. Plusieurs mécanismes semblent impliqués. Le premier résulte d'un stress du réticulum endoplasmique dans le tissu hépatique, adipeux et dans les macrophages qui l'infiltrent (124, 125). En réponse à ce stress, les voies de signalisation de l'inflammation NF- κ B et JNK sont activées. Ces voies sont également activées par un second mécanisme de stress cellulaire qui repose sur la production de radicaux libres suite à l'activation de la NADPH oxydase par l'accumulation lipidique (124, 126). Une action similaire pourrait enfin résulter de l'accumulation intracellulaire de métabolites des acides gras libres tels que le diacylglycerol (124, 127). L'activation de ces voies accroît la production par le tissu adipeux d'adipokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β , leptine, resistine...) (Figure 19) (128), dont certaines comme le TNF α activent à leur tour d'avantage les voies NF- κ B et JNK. Il existe parallèlement une augmentation de l'expression de facteurs de transcription, de récepteurs membranaires, de molécules d'adhésion, de chimiokines (MCP-1...) et d'autres médiateurs (PAI-1) impliqués dans la physiopathologie du syndrome métabolique. Sous l'action de MCP-1, de nouveaux monocytes sont recrutés au sein du tissu adipeux, où ils sécrètent des cytokines et des chimiokines similaires à celles produites par les adipocytes ainsi que d'autres molécules qui amplifient le développement de l'inflammation. La fixation des acides gras libres sur le récepteur TLR4 contribue également à l'activation de ces voies de l'inflammation (90). Il est important de noter que la résistance à l'insuline peut également, par elle-même, promouvoir l'inflammation (91). L'inflammation apparaît donc à l'interface entre l'obésité viscérale et le syndrome métabolique.

Enfin, l'élévation de la pression artérielle retrouvée chez les patients atteints de syndrome métabolique semble être la résultante de plusieurs phénomènes. L'obésité serait impliquée dans l'étiologie de l'hypertension par des mécanismes affectant la vasoconstriction, notamment par l'intermédiaire d'une libération accrue d'angiotensinogènes (129) (Figure 19).

Ainsi la résistance à l'insuline est associée à l'obésité viscérale abdominale mais le sens du lien de causalité entre ces deux phénomènes reste débattu. L'essentiel des critères qui contribuent à définir le syndrome métabolique peut être lié à l'insulino-résistance, mais celle-ci ne rend pas compte de toutes les anomalies observées chez ces patients et d'autres facteurs semblent être impliqués. En plus de ces composantes classiques, d'autres désordres pathologiques non inclus dans les définitions ont été identifiés plus récemment chez les sujets présentant un syndrome métabolique. Ces anomalies sont étroitement associées à un stress

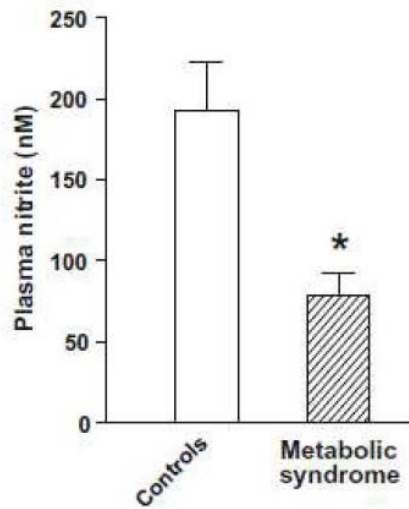


Figure 21 : Concentration de nitrites plasmatiques chez les individus sains (controls) ou atteints de syndrome métabolique

* $P < 0,05$. Modifié d'après (14).

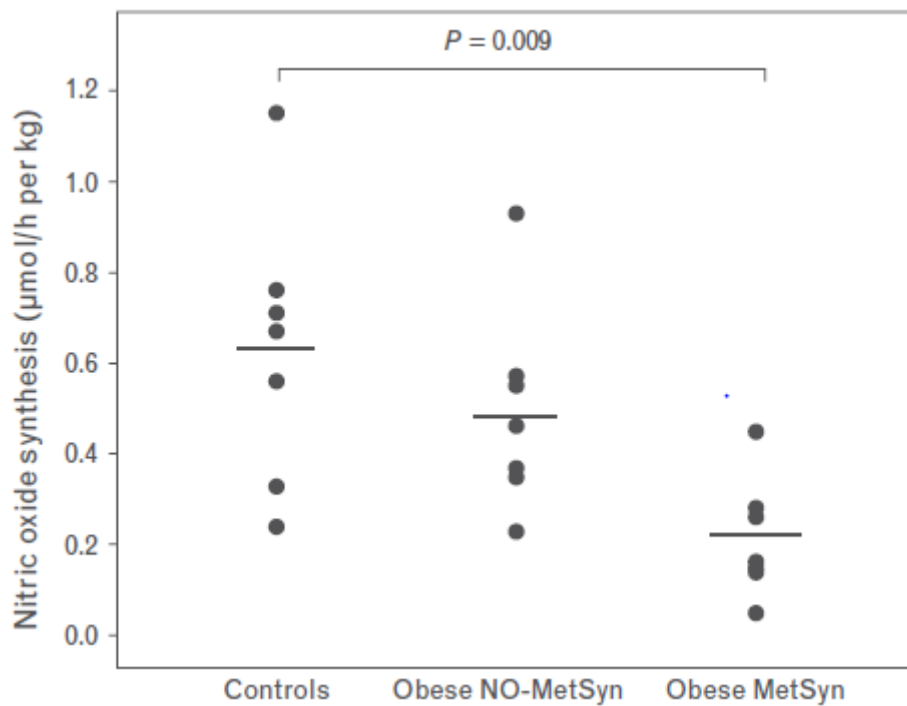


Figure 22 : Synthèse de NO chez les patients obèses présentant un syndrome métabolique

Synthèse individuelle (points) et moyenne (barre) de NO chez des sujets obèses avec ou sans syndrome métabolique (MetSyn), comparativement à des sujets sains de poids normal. D'après (17).

oxydant accru et à une dysfonction endothéliale (91). Il paraît donc important de comprendre le lien entre ces anomalies et le syndrome métabolique.

2.2. NO et physiopathologie du syndrome métabolique

2.2.1. Implication du NO dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Chez les patients atteints de syndrome métabolique, une diminution des concentrations plasmatiques de nitrites par rapport aux individus sains a été observée, reflétant une altération de la synthèse et/ou biodisponibilité du NO (14) (Figure 21). Ces données ont été récemment confirmées dans une étude où il a été observé une diminution de la synthèse du NO corps entier, chez des patients atteints de syndrome métabolique. Dans cette même étude, les niveaux de synthèse du NO chez les patients obèses non atteints de syndrome métabolique étaient intermédiaires entre les individus sains et ceux atteints de syndrome métabolique (17) (Figure 22). Cette altération de la synthèse du NO semble liée aux différentes composantes du syndrome métabolique. Elle est retrouvée chez les patients obèses, hypertendus, ou encore insulino-résistants (130). Notamment, la présence d'insulino-résistance est associée à une diminution de la synthèse de NO et de l'activité de la eNOS (9). Le stress oxydant, qui accompagne la présence de syndrome métabolique, est aussi considéré comme un des phénomènes-clés impliqués dans la diminution de la biodisponibilité du NO. Par ailleurs, la présence du syndrome métabolique a été associée aux polymorphismes du gène de la eNOS chez l'homme (131). De façon intéressante, il a été montré que les souris déficientes pour le gène de la eNOS, affichaient plusieurs des composantes du syndrome métabolique, y compris l'hypertension, la dyslipidémie, l'insulino-résistance et une prise de poids accrue (132) (Figure 23). D'autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence des effets bénéfiques d'une supplémentation en arginine sur les composantes du syndrome métabolique, qui seraient en partie attribués à la modulation de la voie de signalisation du NO. Il a ainsi été montré chez l'homme, qu'une supplémentation orale à long terme en arginine diminuait la masse adipeuse chez les patients obèses atteints de diabète de type 2 (133) et qu'elle améliorait la sensibilité à l'insuline (134).

2.2.2. Dysfonction endothéliale au sein du syndrome métabolique

La dysfonction endothéliale est l'anomalie la plus précoce de l'atteinte vasculaire et participe activement à l'initiation et à la progression de l'athérosclérose associée au syndrome métabolique. Un état de dysfonction endothéliale est diagnostiqué de façon précoce chez les

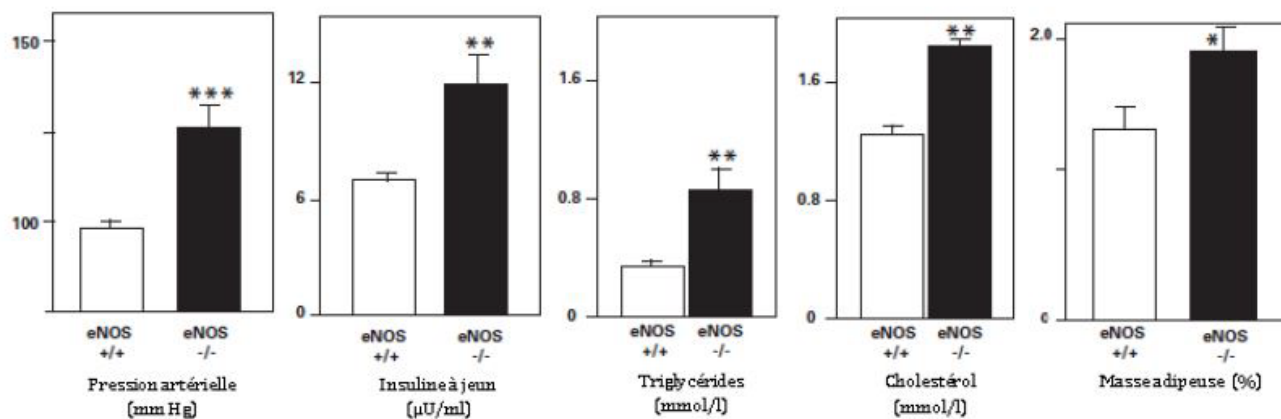


Figure 23 : Effet de l'invalidation du gène de la eNOS chez la souris sur les composantes du syndrome métabolique

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Modifié d'après (132).

patients atteints de syndrome métabolique. En effet, la dysfonction endothéliale est bien décrite chez les sujets atteints d'hypertension artérielle, d'hypertriglycéridémie, avec un faible taux d'HDL-cholestérol et une intolérance au glucose (105). Le mécanisme exact par lequel le syndrome métabolique induit la dysfonction endothéliale reste à préciser. Beaucoup des composantes du syndrome métabolique, telles que l'hyperglycémie, l'excès d'acides gras libres et l'insulino-résistance, peuvent entraîner une dysfonction endothéliale par leurs effets sur la synthèse et la dégradation du NO (135), qui se caractérise notamment par une altération de la vasodilatation endothéliale dépendante, une réduction de la compliance artérielle et une accélération du processus d'athérosclérose (91). Récemment, il a été rapporté que la combinaison de facteurs de risque du syndrome métabolique était associée à une diminution de la vasodilatation dépendante du flux sanguin ou FMD (pour Flow mediated-dilation; voir chapitre E) (136). Les anomalies métaboliques, hormonales et hémostatiques les plus fréquentes chez les patients atteints du syndrome métabolique, qui peuvent contribuer à la dysfonction endothéliale, sont : l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie, l'hypoHDLémie, des concentrations élevées d'acides gras libres, de LDL-cholestérol, d'apolipoprotéine B, de facteur de croissance à l'insuline-1, d'angiotensine II, de PAI-1, de CRP, ainsi que le stress oxydant (91, 137).

L'accumulation du tissu adipeux viscéral joue un rôle délétère sur la fonction endothéliale (138). De récentes observations ont montré que les cytokines produites par le tissu adipeux, induisaient une inflammation chronique conduisant à une résistance à l'insuline et à une dysfonction endothéliale. Il a également été montré qu'une augmentation des concentrations de PAI-1 et de la CRP, ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques d'adiponectine (139), étaient corrélées à une dysfonction endothéliale (140). En outre, la dysfonction endothéliale a été décrite chez les enfants atteints d'obésité sévère, suggérant qu'elle pourrait être une étape précoce liant l'obésité et l'athérosclérose (141). L'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline jouent également un rôle important dans la dysfonction endothéliale. Bien que normalement, l'insuline stimule la synthèse de NO et augmente la vasodilatation induite par le NO, son action est diminuée ou annulée en cas de résistance à l'insuline, comme c'est le cas dans le syndrome métabolique. Le mécanisme exact par lequel la résistance à l'insuline induit une dysfonction endothéliale reste à clarifier, mais il a été suggéré, qu'en plus de la diminution de la synthèse de NO et de la réponse au NO, la résistance à l'insuline est associée à une augmentation de la synthèse de l'ET-1 (142), qui peut provoquer une vasoconstriction et qui joue un rôle important dans le développement de l'hypertension artérielle (137). De plus l'insulino-résistance conduit à l'expression de

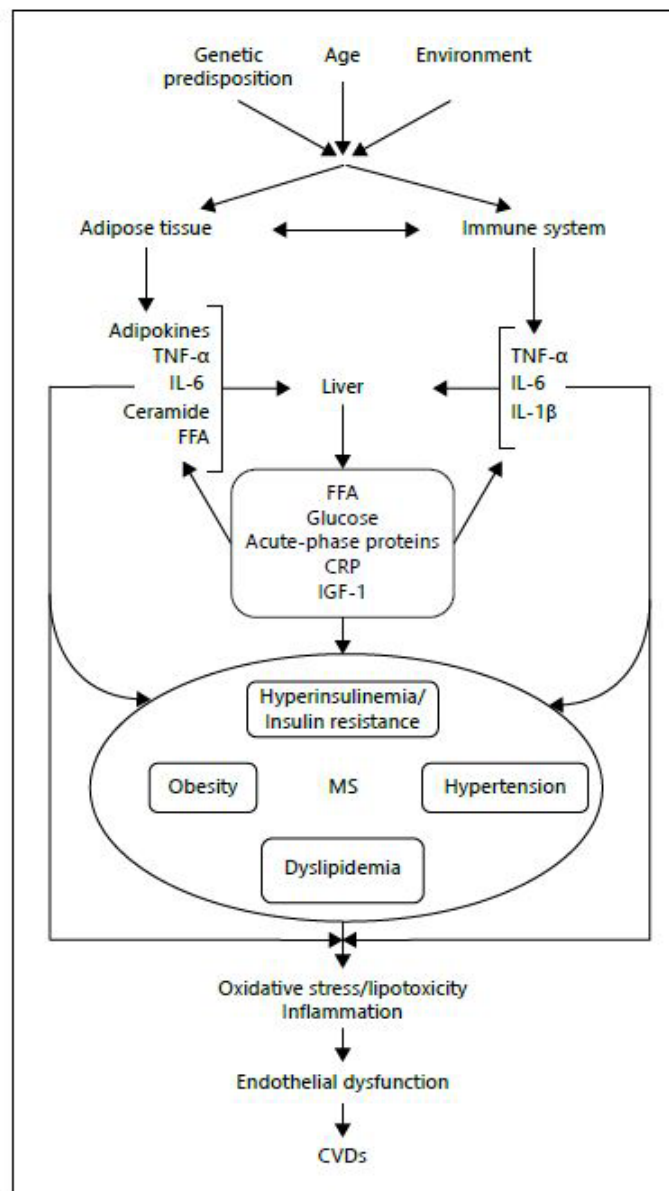


Figure 24 : Inflammation à bas bruit, dysfonction endothéliale et syndrome métabolique

L'état d'inflammation chronique contribue au syndrome métabolique. Les facteurs inflammatoires dérivés du tissu adipeux, du foie et des cellules du système immunitaire conduisent à une dysfonction endothéliale, qui contribue au développement des maladies cardiovasculaires. CVDs : cardiovascular diseases, FFA : free fatty acids, MS : metabolic syndrome. *D'après (399).*

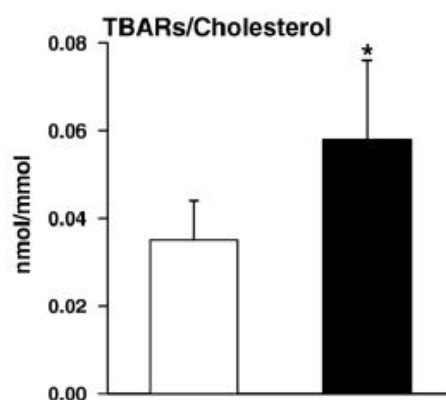


Figure 25 : Implication du stress oxydant dans la physiopathologie du syndrome métabolique

Implications des TBARs (thiobarbituric acid active substances) et du cholestérol (facteur de correction) plasmatiques chez les individus sains (barre blanche) ou atteints de syndrome métabolique (barre noire). * $P < 0,001$. *D'après (147).*

molécules d'adhésions vasculaires et à l'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses (91). L'hypercholestérolémie participe aussi à la genèse de la dysfonction endothéliale. Le dépôt de cholestérol dans les couches sous-endothéliales induit un état inflammatoire avec l'intervention de macrophages, le recrutement de cellules lymphocytaires et l'oxydation des LDL. Cet état inflammatoire conduit à une diminution de la biosynthèse et à une inactivation du NO (143). L'hyperglycémie altère directement la fonction endothéliale, en induisant l'apoptose des cellules endothéliales, en diminuant leur prolifération, en augmentant leur perméabilité et en diminuant la biodisponibilité du NO (144). Enfin l'élévation chronique de la pression artérielle est souvent associée à une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante. Chez les sujets hypertendus, la dysfonction endothéliale semble être principalement due à une anomalie de la biodisponibilité du NO, mais pourrait aussi être secondaire à une libération accrue de facteurs vasoconstricteurs, tels que les radicaux libres (145). Ainsi, la dysfonction endothéliale agirait comme un précurseur commun reliant l'inflammation chronique, l'obésité, la résistance à l'insuline, et le développement de maladies cardiovasculaires (105) (Figure 24).

2.2.3. Stress oxydant dans le syndrome métabolique

Les marqueurs de risque cardiovasculaire classiques sont associés à une augmentation du stress oxydant qui se traduit par une bioactivité réduite du NO (105). Ainsi, le stress oxydant vasculaire constitue un autre mécanisme physiopathologique du syndrome métabolique lié à la dysfonction endothéliale (105). Le stress oxydant est décrit comme un mécanisme important dans la physiopathologie de l'obésité et du syndrome métabolique (126). Une forte association est retrouvée entre le diagnostic d'un syndrome métabolique et l'état de stress oxydant (146). De plus, les marqueurs du stress oxydant sont augmentés chez les patients présentant un syndrome métabolique (Figure 25) (147). En effet, les composantes du syndrome métabolique sont caractérisées par une surproduction de ROS. L'obésité abdominale, les désordres du métabolisme lipidique, tels que l'accumulation des lipides au niveau hépatique, ainsi que l'insulino-résistance qui en résulte, mais aussi l'hyperglycémie, activent la génération de ROS par différentes sources (cytochromes, mitochondries et peroxysomes). Divers mécanismes sont avancés pour expliquer cette surproduction de ROS, parmi lesquels l'excès de peroxydation lipidique, l'oxydation des LDL et la surexpression de la NADPH oxydase. En parallèle, les défenses antioxydantes sont significativement abaissées chez les patients atteints de syndrome métabolique, aggravant ainsi l'état de stress oxydant (148). A titre d'exemple, les concentrations plasmatiques des vitamines C et E, qui participent

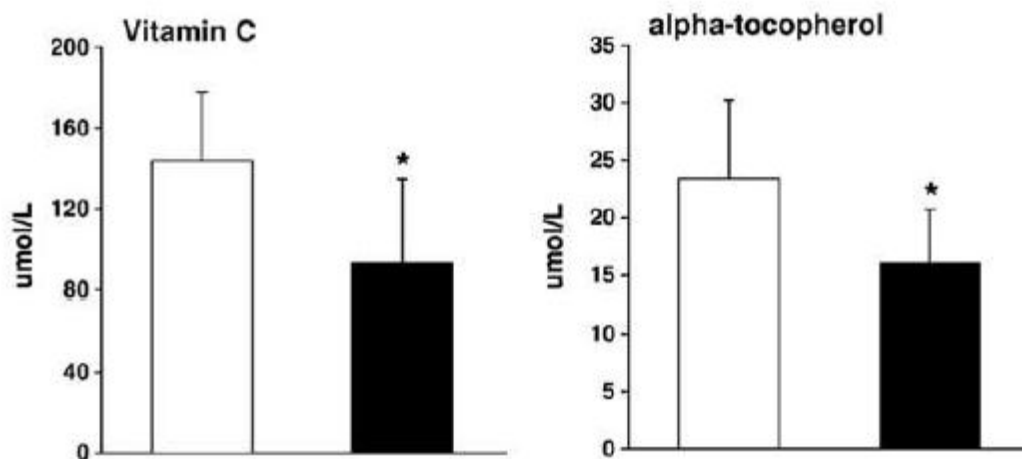


Figure 26 : Concentrations plasmatiques de vitamine C et E chez les individus sains ou atteints de syndrome métabolique.

Concentrations plasmatiques de vitamine C et E (alpha-tocophérol) chez les individus sains (barre blanche) ou atteints de syndrome métabolique (barre noire). *P<0,001. D'après (147).

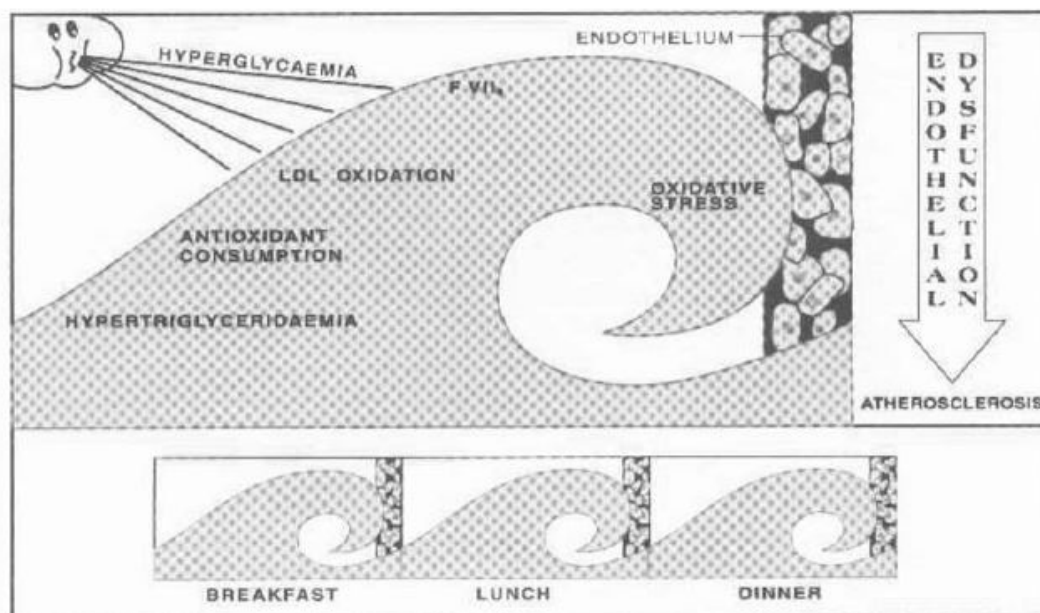


Figure 27 : Hyperglycémie et dysfonction endothéliale postprandiale

Postulat de l'effet de l'hyperglycémie représentée ici comme une forte houle déchainant la vague d'évènements postprandiaux indésirables. D'après (400).

aux défenses antioxydantes non-enzymatiques de l'organisme, sont abaissées significativement en présence de syndrome métabolique (Figure 26) (147). Ces données soutiennent l'idée d'un rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale associée au syndrome métabolique. Ce dernier entraîne des dommages cellulaires et vasculaires favorisant l'installation de l'insulino-résistance, de la dysfonction endothéliale et de l'inflammation (149). Il participe de façon critique au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2 (150, 151).

En conclusion, la physiopathologie du syndrome métabolique est régie par des phénomènes complexes interagissant entre eux et dépendant les uns des autres. L'état de connaissance actuelle ne permet pas encore de les hiérarchiser complètement. Les dysfonctions telles que le stress oxydant et la dysfonction endothéliale, pouvant contribuer à différentes échelles aux mécanismes physiopathologiques associés au syndrome métabolique, représentent de nouveaux mécanismes-cibles pour la compréhension des processus régissant ce syndrome, et permettent ainsi de développer de nouvelles stratégies pour sa prise en charge.

3. Rôle de la dysfonction endothéliale postprandiale dans la physiopathologie du syndrome métabolique

La phase postprandiale est une phase critique de gestion métabolique de l'afflux de nutriments. En effet, lors de cette phase, la dynamique métabolique doit permettre de satisfaire aux principes de l'homéostasie tout en permettant une utilisation optimale de l'arrivée des nutriments. De très nombreuses études ont démontré que de fortes provocations métaboliques, avec des repas riches en acides gras saturés et en sucres simples, entraînent des phénomènes délétères d'inflammation à bas bruit et de stress oxydant qui sont étroitement liés à une dysfonction endothéliale (152-158).

L'ampleur et la chronologie d'apparition de ces phénomènes sont étroitement liées à l'excursion lipémique et glycémique postprandiales (157, 159). En effet, l'hyperglycémie implique des processus métaboliques qui sont responsables d'une augmentation de la production de radicaux libres et d'un stress oxydant (Figure 27). Ces modifications favorisent la dysfonction endothéliale qui se traduit notamment par un état pro-thrombotique et pro-inflammatoire. Il a été rapporté que chez des sujets atteints de diabète de type 2, une hyperglycémie postprandiale était associée à une dysfonction endothéliale (160, 161). L'équipe de Giugliano a, quant à elle, montré que l'induction d'une très forte hyperglycémie

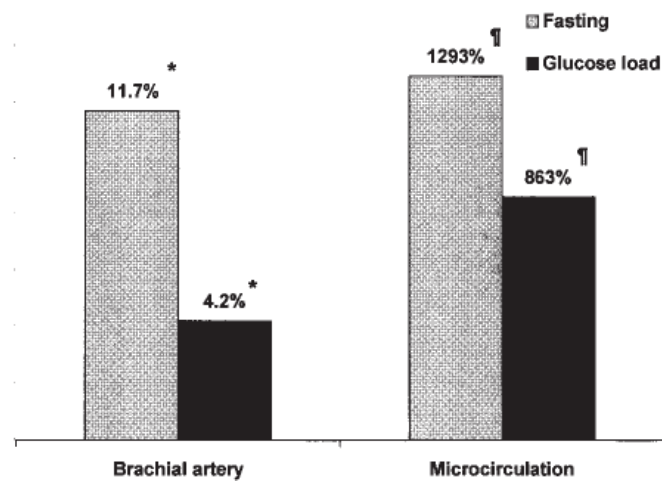


Figure 28 : Altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par une charge orale modérée en glucose chez des sujets sains

La vasodilatation endothélium-dépendante de l'artère brachiale et de la microcirculation de l'avant-bras est réduite 1 h après l'ingestion de 75 g de glucose (barre noire) comparativement aux conditions à jeun (barre grise). *: $P < 0.001$, ¶: $P < 0.002$. D'après (163).

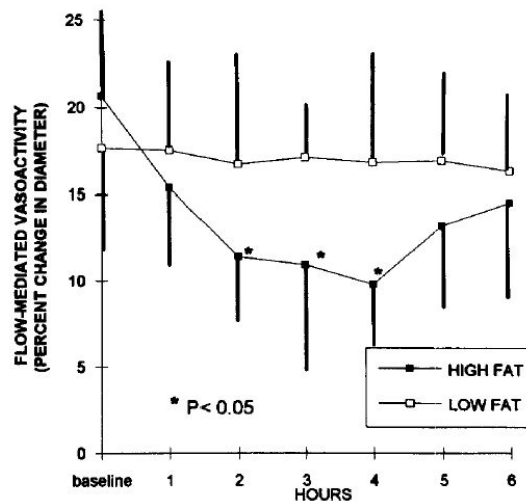


Figure 29 : Altération postprandiale de la FMD après l'ingestion d'un repas hyperlipidique ou de faibles doses de lipides

Une diminution postprandiale de la réactivité vasculaire chez des sujets sains ($n=10$) est observée après un repas hyperlipidique (High-fat, 900 kcal contenant 50g de lipides) par rapport à un repas contenant de faibles doses en lipides (Low-fat, 900 kcal, 13mg cholestérol). D'après (156).

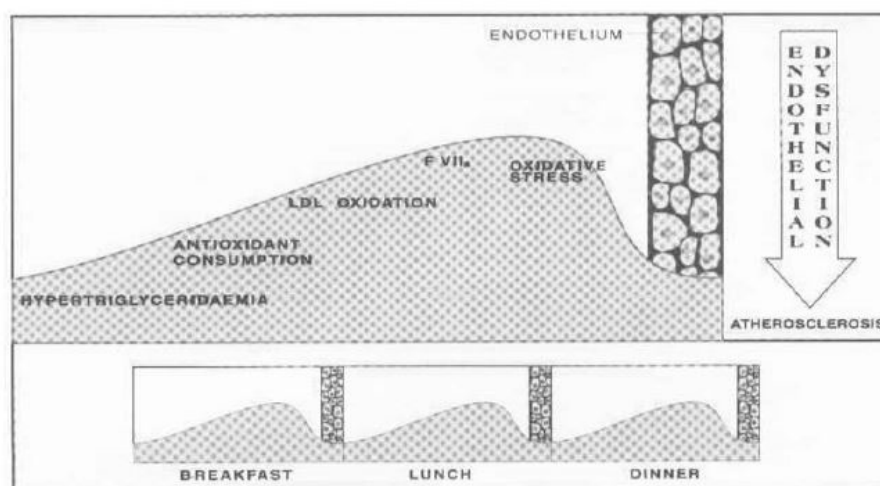


Figure 30 : Dysfonction endothéliale observée pendant la phase postprandiale

Concept de la vague d'évènements indésirables caractérisant la dysfonction endothéliale induite pendant la phase postprandiale. D'après (400).

chez des sujets sains, provoquait une diminution des fonctions vasculaires, de façon NO-dépendante (162). Une autre étude a montré, chez des sujets sains, une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par une charge orale modérée en glucose (163) (Figure 28). Enfin, il a également été montré que l'hyperlipidémie induit une altération des fonctions vasculaires en situation postprandiale (156) (Figure 29). Cette altération se traduit notamment par une activation endothéliale caractérisée, en partie, par une augmentation de l'état pro-coagulant.

Il semble que la dysfonction endothéliale observée en situation postprandiale joue un rôle prépondérant dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose et du syndrome métabolique (Figure 30). En effet, l'ensemble des phénomènes inflammatoires postprandiaux est d'autant plus patent que les sujets présentent un syndrome métabolique (164) et de façon plus générale, lorsque les sujets présentent au préalable une moindre capacité de régulation métabolique, associée à des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et diabétiques. Ainsi, le paradigme actuel est que la répétition de ces événements transitoires et silencieux, lors des phases postprandiales, pourrait être un mécanisme d'initiation et de progression des dérégulations métaboliques et des maladies cardiovasculaires et diabétiques (154, 165).

3.1. Inflammation à bas bruit et dysfonction endothéliale postprandiale

L'inflammation postprandiale, décrite au niveau systémique (153, 161) a été rapportée au niveau des leucocytes circulants (158, 159), du tissu adipeux viscéral (166), et bien sûr au niveau vasculaire. Elle se traduit par l'augmentation des concentrations circulantes en molécules d'adhésion endothéliales (ICAM-1 et VCAM-1) (155), ou par l'altération de fonctions plus larges ou intégratives relevant de la fonction endothéliale et attestant de l'activation de nature inflammatoire de l'endothélium. De très nombreuses études ont démontré que des repas de charge hyperlipidiques et/ou hyperglucidiques induisent une augmentation postprandiale des concentrations plasmatiques en facteurs pro-thrombotiques (par ex. PAI-1), en cytokines pro-inflammatoires (par ex. IL-6, IL-8), et en molécules d'adhésion (par ex. ICAM-1, VCAM-1) chez des sujets sains ou à risque cardiovasculaire (152, 154). De façon assez nette, l'équipe de Van Oostrom a rapporté que des repas de charge induisaient chez le sujet sain une altération de la fonction endothéliale associée à une inflammation à bas bruit postprandiale, se traduisant notamment par une augmentation des neutrophiles (167). Cette hypothèse a été renforcée par l'observation d'une augmentation postprandiale de l'expression de marqueurs d'activation des leucocytes, impliqués dans l'adhésion à l'endothélium, chez des sujets sains après un repas hyperlipidique (158, 159)

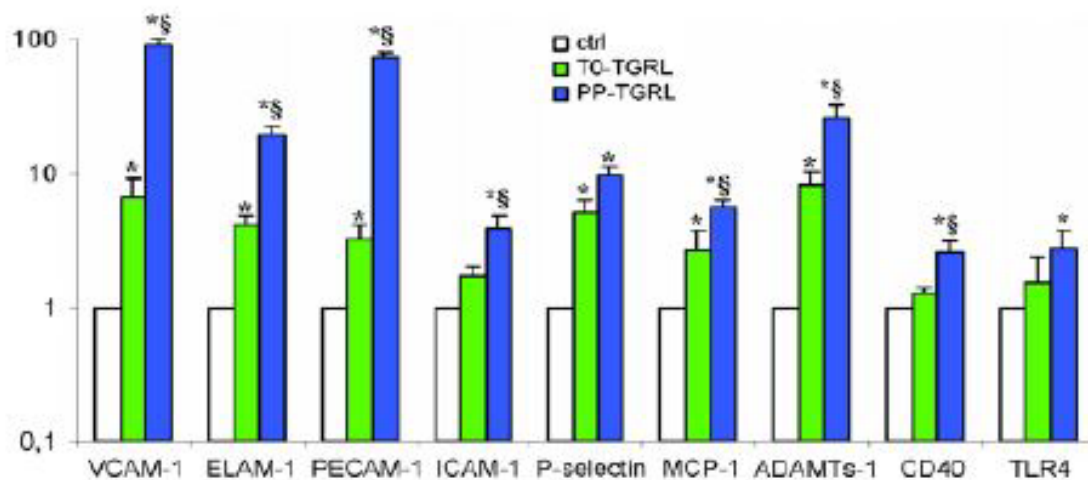


Figure 31 : Expression de marqueurs pro-inflammatoires au niveau de cellules endothéliales, cultivées en présence de lipoprotéines riches en triglycérides (TGRL)

L'incubation dans le milieu de culture d'HUVEC, de TGRL prélevés chez des sujets hypertriglycéridémiques, à jeun (T0) ou 4 h après l'ingestion d'un repas hyperlipidique (PP, 82 % de lipides), induit une augmentation significative de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires. Pour tous ces marqueurs, cette augmentation est beaucoup plus marquée en utilisant des TGRL prélevés en situation postprandiale. *D'après (401).*

(Figure 31). Dès la phase postprandiale, il y aurait donc une augmentation du nombre de neutrophiles, et de leur capacité d'adhésion à l'endothélium, qui caractériserait ainsi l'état pro-inflammatoire aigu postprandial (158). Enfin, l'apparition d'un stress oxydant semble être un important contributeur à l'inflammation postprandiale (168, 169) et à la dysfonction endothéliale.

3.2. Stress oxydant et dysfonction endothéliale postprandiale

Un grand nombre d'études rapporte une augmentation du stress oxydant après une charge alimentaire (170, 171), en étroite relation avec l'apparition des phénomènes inflammatoires (172). De façon intéressante, deux études ont montré une augmentation de la synthèse de ROS par les leucocytes après un repas hyperlipidique (172, 173). Un élément important, en faveur de l'implication du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale postprandiale, est fourni par les différentes études qui ont montré qu'un prétraitement ou la co-administration de fortes doses de vitamines et/ou de substances antioxydantes, après un repas hyperlipidique ou hyperglucidique, prévenait l'altération de la FMD et réduisait l'expression de certains marqueurs inflammatoires et de molécules d'adhésion dans la phase postprandiale, tels que l'IL-6, le TNF- α , VCAM-1 et ICAM-1 (174, 175). L'ensemble de ces études suggèrent que le stress oxydant postprandial est un mécanisme explicatif majeur impliqué dans la dysfonction endothéliale postprandiale (169). De plus, au niveau vasculaire, la production/biodisponibilité du monoxyde d'azote est bien connue pour être très sensible au statut redox (168). Cependant, au cours de la phase postprandiale, le métabolisme du NO n'a été que très peu exploré. Enfin, il est à noter que certaines études n'ont pas rapporté de stress oxydant postprandial, mais cela pourrait s'expliquer par un choix de marqueurs insuffisamment sensibles, ou par le fait que les signes du stress oxydant au niveau systémique (c.-à-d. évalué à partir du plasma) sont intrinsèquement faibles.

Bien que les mécanismes n'aient pas encore été totalement élucidés, il est donc communément admis que l'hyperlipidémie et l'hyperglycémie induisent une dysfonction endothéliale par l'intermédiaire de phénomènes délétères de stress oxydant et d'inflammation à bruit. De façon intéressante, des supplémentations en certains acides aminés, jouant un rôle important dans la synthèse du NO ou encore dans l'homéostasie redox, sembleraient moduler la fonction endothéliale. L'apport protéique pourrait ainsi jouer un rôle dans la modulation nutritionnelle de la fonction endothéliale et ainsi dans la prévention du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires de façon plus générale.

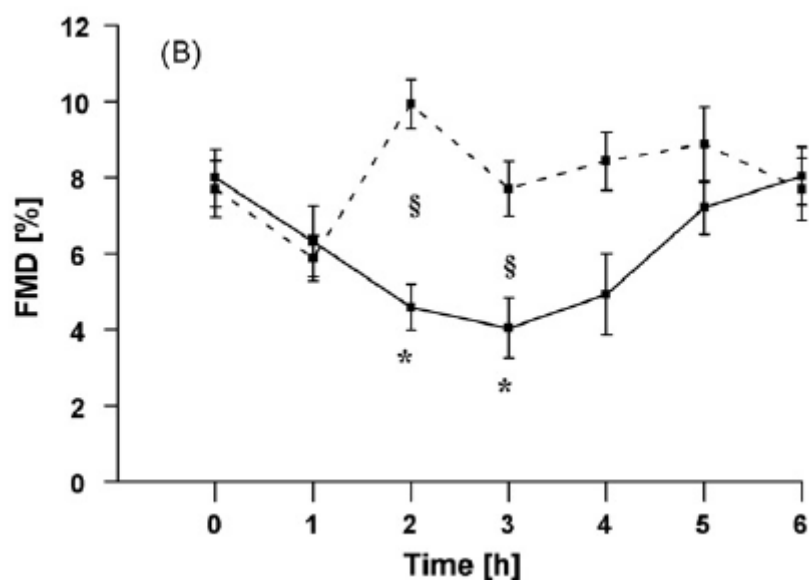


Figure 32 : Effet d'un apport en arginine sur la FMD postprandiale de sujets sains

Cinétique postprandiale de la FMD chez des sujets sains (n=15) après l'ingestion d'un repas hyperlipidique seul (1 g lipides/kg de poids corporel, ligne continue) ou avec de 2,5 g d'arginine (ligne pointillée). L'ajout de 2,5 g d'arginine au repas de charge prévient la diminution postprandiale de la FMD. * $P < 0,0125$, significativement différent du basal; § $P < 0,0125$, significativement différent du repas de charge. D'après (178).

3. Rôle d'un apport protéique dans la prévention du syndrome métabolique.

Peu d'études ont été réalisées sur les effets de modulation de l'apport alimentaire protéique sur les fonctions vasculaires, mais il semble intéressant d'analyser avec précision le potentiel d'un apport protéique à moduler la fonction endothéliale, et d'évoquer les possibles mécanismes sous-jacents. Récemment, il a été démontré que l'addition de charges protéiques à un repas hyperlipidique neutralisait la dysfonction endothéliale induite chez des sujets sains (176, 177). En effet, Westphal *et al.*, ont montré que l'ajout de protéines à un repas hyperlipidique permettait de maintenir, inaltérée, la fonction endothéliale tout au long de la période postprandiale. Ainsi la supplémentation en protéines du repas de charge lipidique a prévenu l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale. Les auteurs ont formulé différentes hypothèses pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, la supplémentation en protéines a très fortement majoré l'excursion insulinique postprandiale. Comme l'insuline a un effet direct favorable sur la fonction endothéliale, ils ont supposé que l'effet favorable des protéines pourrait s'expliquer en grande partie par leur effet insulinothèque. Les auteurs ont aussi proposé que l'apport d'arginine par les protéines puisse expliquer la préservation de la fonction endothéliale. Cette hypothèse a été étayée par la suite, par cette même équipe, qui a montré que l'ajout de 2,5 g d'arginine au repas hyperlipidique suffisait à prévenir l'altération postprandiale de la fonction endothéliale (178) (Figure 32), confirmant un résultat précédent obtenu avec une dose d'arginine beaucoup plus forte (179). Ainsi, l'ensemble de ces travaux suggère que la nature de l'apport protéique et sa composition en acides aminés sont importants pour évaluer l'effet d'une supplémentation protéique sur la fonction endothéliale vasculaire.

La littérature sur la modulation de la fonction endothéliale par un apport protéique est principalement centrée sur l'effet de suppléments en acides aminés ayant un impact potentiel sur les différentes fonctions de l'endothélium. Une importante littérature s'est concentrée sur l'impact de l'arginine, en tant que précurseur du NO.

C. Intérêt d'un apport en arginine dans la modulation nutritionnelle de la dysfonction endothéliale

La modulation nutritionnelle de la fonction endothéliale, au travers de la modulation de la synthèse de NO, chez l'homme sain, à risque ou malade, a fait l'objet d'un fort intérêt depuis

les années 90 (16, 21). L'arginine, acide aminé présent dans les protéines alimentaires, se trouve être le précurseur biochimique du NO. L'arginine a donc été naturellement considérée depuis longtemps comme un candidat sérieux à cette modulation du signal NO et il a été constaté que la supplémentation en arginine pouvait moduler, de fait, de nombreuses fonctions associées au NO (22-25, 98). Chez l'Homme notamment, il a été démontré que des suppléments aiguës ou chroniques en L-arginine, à fortes doses, avaient un effet bénéfique sur la fonction endothéliale et l'homéostasie redox de sujets malades ou à risque cardiovasculaire (24, 180). Il semble donc intéressant de comprendre, à quelles doses, chez quel type de sujets et par quels mécanismes précis, l'arginine exerce des effets bénéfiques sur les fonctions vasculaires.

Afin de comprendre comment un apport alimentaire en arginine est susceptible de moduler la fonction endothéliale par l'intermédiaire de la synthèse en NO, il est nécessaire d'avoir un bref aperçu du métabolisme de l'arginine.

1. Métabolisme de l'arginine

L'arginine, acide aminé conditionnellement essentiel chez l'Homme, est l'un des acides aminés les plus polyvalents, et sert de précurseur pour la synthèse des protéines, du NO, de l'urée, des polyamines, de la proline, du glutamate, de la créatine et de l'agmatine (181). Les rôles physiologiques et les relations entre les voies de synthèse et de catabolisme de l'arginine sont complexes et difficiles à analyser, en raison de l'expression compartimentée des diverses enzymes, à la fois au niveau des organes (par ex. le foie, l'intestin grêle et les reins) et au niveau subcellulaire (cytosolique et mitochondrial), mais également en raison des changements dans leur expression au cours du développement et en réponse à l'alimentation, aux hormones et aux cytokines (54). Le métabolisme de l'arginine est aussi modulé par les activités de divers transporteurs qui transportent l'arginine et ses métabolites à travers les membranes plasmiques et mitochondriales (182). Enfin, le métabolisme de l'arginine joue un rôle majeur dans la physiologie et la physiopathologie cardiovasculaires, en grande partie par l'intermédiaire de processus NO-dépendants (24, 25).

1.1. Synthèse endogène, absorption et biodisponibilité de l'arginine

1.1.1. Sources d'arginine et synthèse endogène

Les sources d'arginine libre qui entrent dans le plasma (flux d'arginine plasmatique) sont exogènes (protéines alimentaires) et endogènes (synthèse endogène à partir de la

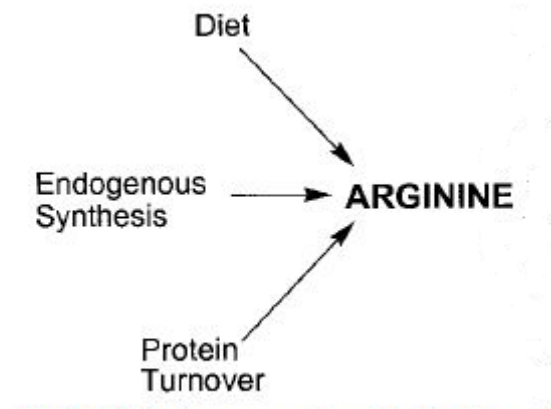


Figure 33 : Sources de l'arginine

D'après (58).

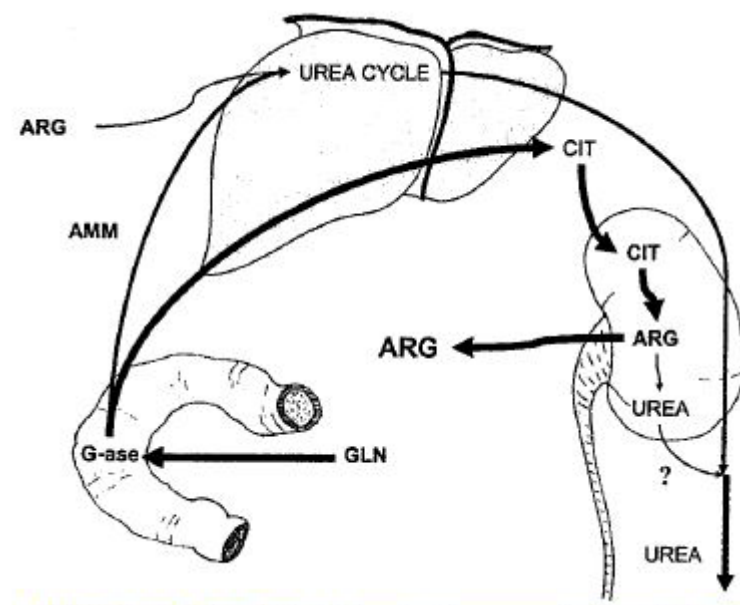


Figure 34 : Synthèse endogène d'arginine : axe intestinal-rénal

ARG : arginine, CIT : citrulline, GLN : glutamine, AMM : ammoniac, G-ase : glutaminase. *D'après (183).*

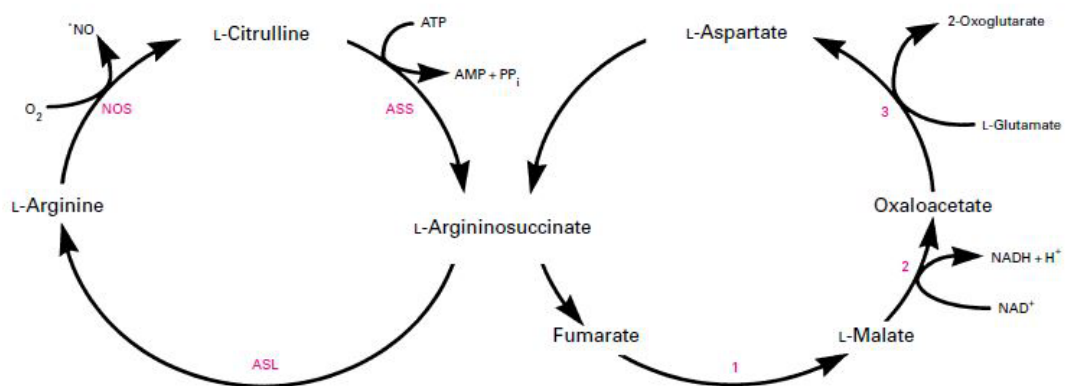


Figure 35 : Cycle citrulline-NO

Les réactions 1, 2 et 3 sont réversibles. *D'après (54).*

citrulline et hydrolyse des protéines corporelles) (57, 181) (Figure 33). A la naissance, l'intestin grêle est le site majeur de synthèse de l'arginine, mais devient progressivement le principal site de synthèse de la citrulline (54). Cette transition est compensée par l'augmentation progressive de la capacité du rein à synthétiser de l'arginine à partir de la citrulline (54). Ainsi, chez l'Homme adulte, le rein est le principal organe impliqué dans la synthèse endogène d'arginine (54, 183).

Environ 60% de la synthèse d'arginine implique une voie inter-organes (également connue comme l'axe intestinal-rénal), dans laquelle l'intestin grêle libère de la citrulline dans la circulation sanguine, qui est ensuite extraite principalement par les reins pour être convertie en arginine (54, 183) (Figure 34). Cette conversion implique l'action consécutive de deux enzymes, l'arginosuccinate synthétase (ASS) et l'arginosuccinate lyase (ASL), qui sont localisées au sein des tubules contournés proximaux (54). Les concentrations plasmatiques en citrulline constituent donc le facteur limitant de cette synthèse endogène d'arginine. Une moindre synthèse intestinale de citrulline limite la formation d'arginine dans l'organisme (184), et de récents travaux montrent qu'un apport oral en L-citrulline induit rapidement une augmentation des concentrations plasmatiques en arginine (185).

Comme la synthèse *de novo* d'arginine compte pour seulement 5-15% du flux d'arginine endogène chez les hommes adultes, le principal contributeur au flux d'arginine endogène est donc la protéolyse (54). Chez le sujet sain, l'homéostasie de l'arginine dépendrait surtout de l'apport alimentaire et du contrôle du catabolisme de l'arginine, et peu d'une modulation de la synthèse endogène d'arginine (à partir de la citrulline) dans les reins (182, 186).

La synthèse *de novo* d'arginine à partir de la citrulline se produit principalement dans les tubules proximaux du rein (54). Cependant, d'autres tissus contenant la NOS peuvent également synthétiser de l'arginine à partir de la citrulline, notamment les tissus où la synthèse de NO est induite (par ex. les macrophages) (54, 187, 188). Dans de tels cas, une partie de la citrulline produite par la NOS peut être recyclée à partir de l'arginine, dans une voie appelée cycle citrulline-NO (54, 187) (Figure 35), pour notamment permettre une forte synthèse de NO. Cette capacité de synthèse d'arginine à partir de la citrulline n'est pas négligeable puisque, chez l'adulte sain, 11 % du flux d'arginine plasmatique dérive de la citrulline plasmatique (189). Cette capacité de recyclage pour la synthèse basale de NO serait notamment présente au niveau de l'endothélium vasculaire (182). L'arginine ainsi synthétisée semble être surtout réutilisée localement. Le foie est également capable de synthétiser des quantités considérables d'arginine. Cependant, du fait de l'organisation étroite des enzymes

de l'uréogénèse en métabolome, les intermédiaires formés aussi bien que l'arginine sont strictement utilisés localement et ne sont pas échangés avec les autres tissus, de sorte que le foie ne contribue que peu ou pas du tout au flux d'arginine plasmatique (190). Le foie ne capte pas non plus de citrulline et ne se présente que comme un tissu utilisateur d'arginine (captée ou surtout formée *in situ*) pour la synthèse d'urée (191). La séparation presque complète entre les pools d'arginine systémique et hépatique est également attribuée en partie au fait que le système actif d'absorption de l'arginine, le système de transport y⁺ (23, 182), a une très faible activité dans les hépatocytes (23).

1.1.2. Absorption et biodisponibilité de l'arginine

L'apport moyen en arginine est donc de l'ordre de 4-5 g/j (192). En raison d'une activité arginase relativement élevée dans la muqueuse intestinale, 40% de l'arginine alimentaire est catabolisée par l'intestin au cours de son absorption avant de pouvoir entrer dans la circulation (23, 192). Seulement moins de 50% de l'arginine alimentaire entre dans la circulation systémique. En effet, malgré quelques contradictions dans la littérature, plusieurs travaux ont rapporté que, chez des sujets sains ayant ingéré une dose de 6 g d'arginine libre, la biodisponibilité de l'arginine dans le plasma variait de 40 à 70 % (193-196). Bien que la raison de ces différences ne soit pas claire, il est évident qu'une fraction importante de l'arginine orale est métabolisée au niveau pré-systémique. L'essentiel de l'extraction de l'arginine, en premier passage, est le fait de l'intestin (54, 196), le foie prélevant relativement peu d'arginine alimentaire, étant donné la très faible activité du transporteur y⁺ dans les hépatocytes (23). Ainsi, une mauvaise absorption intestinale (197), une fonction altérée des organes comme une dysfonction intestinale (198) ou une dysfonction rénale (199), la compétition enzymatique pour le substrat, ou encore une absorption cellulaire altérée peuvent compromettre la biodisponibilité de l'arginine cellulaire (184). Par exemple, dans des conditions normales, l'arginine plasmatique à jeun est comprise entre 80 et 100 µM alors que chez des patients atteints d'un sepsis, l'arginine plasmatique est diminuée jusqu'à 50 µM (184, 200). L'axe intestinal-rénal étant altéré lors d'un sepsis (201), cela peut conduire à une biodisponibilité limitée de la citrulline et donc à une synthèse d'arginine limitée (184). Très récemment, il a été rapporté, chez des sujets sains, qu'un apport en arginine orale provoquait une augmentation importante et dose-dépendante des concentrations plasmatiques en arginine (196). La concentration maximale d'arginine est atteinte entre 1 et 1,5 h après l'ingestion, et la demi-vie de l'arginine est de 1,5-2 h après une dose orale de 6 g (193).

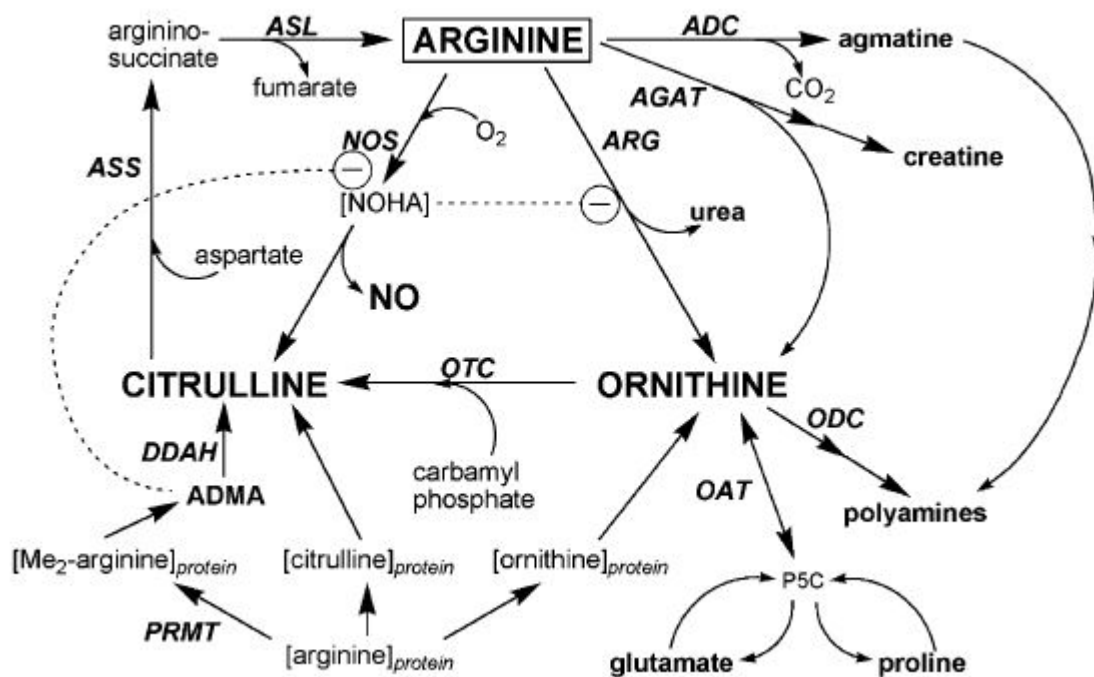


Figure 36 : Interactions entre les différentes voies du métabolisme de l'arginine

L'inhibition de la NOS et de l'arginase par l'ADMA et la NOHA, respectivement, est indiquée par les lignes pointillées. ADC : arginine décarboxylase, AGAT : arginine:glycine amidinotransferase, ARG : arginase, ASL : argininosuccinate lyase, ASS : argininosuccinate synthetase, DDAH : diméthylarginine diméthylaminohydrolase, OAT : ornithine aminotransferase, ODC : ornithine décarboxylase, OTC : ornithine transcarbamylase, P5C : L-1-pyrroline-5-carboxylate, PRMT : protein-arginine methyltransferase. *D'après (58).*

1.2. Catabolisme de l'arginine

1.2.1. Des voies multiples de catabolisme

Notre connaissance du catabolisme de l'arginine *in vivo* est limitée, en grande partie à cause de la compartimentation complexe du métabolisme de l'arginine, à la fois au niveau des organes, mais aussi au niveau subcellulaire. L'arginine peut être catabolisée par des voies multiples (Figure 36), dont plusieurs sont co-exprimées dans la même cellule (54, 57). Ceci peut entraîner des interactions complexes, par lesquelles le produit d'une enzyme peut inhiber l'activité d'une autre enzyme, comme par exemple l'inhibition de l'arginase par la NOHA (58) (Figure 36). L'arginine est utilisée comme substrat par cinq ensembles d'enzymes. Ainsi, en plus de l'arginyl-ARNt synthétase, quatre familles d'enzymes chez les mammifères utilisent l'arginine libre comme substrat : les NOS, les arginases, l'arginine:amidinotransférase glycine et l'arginine décarboxylase. Certaines enzymes possèdent plusieurs isoformes (NOS et arginases), différents profils d'expression qui sont tissu-spécifiques, différentes localisations subcellulaires et différents types de régulation. On distingue ainsi cinq voies de catabolisme de l'arginine (54, 57) (Figure 36):

- 1- la protéosynthèse, qui constitue la voie métabolique principale de l'arginine;
- 2- la synthèse d'urée et d'ornithine par la voie arginase (54). Cette réaction intervient dans le cadre du cycle de l'urée, localisée dans le foie, mais il a été montré que cette réaction avait également lieu de façon significative dans l'intestin grêle et toutes les cellules exprimant une activité arginase (202). L'ornithine est le précurseur des polyamines, de la proline et du glutamate.
- 3- la synthèse de créatine;
- 4- la synthèse de NO et de citrulline;
- 5- la synthèse d'agmatine et de CO₂.

Il est désormais évident que les deux isoformes de l'arginase chez les mammifères jouent un rôle clé dans la régulation de la plupart des aspects du métabolisme de l'arginine (181). De plus, le couplage entre les enzymes de synthèse et de conversion de l'arginine ou la compétition entre les enzymes pour l'arginine en tant que substrat, déterminent son devenir métabolique, bien que l'organisation étroite des enzymes n'ait pas été identifiée (57). Par exemple, le couplage entre la synthèse *de novo* d'arginine et la synthèse de NO est supporté par la colocalisation, dans les cellules endothéliales, de eNOS et des enzymes ASS/ASL (203). D'autre part, les enzymes du catabolisme de l'arginine sont souvent co-exprimées dans la plupart des tissus, et les métabolites de chaque voie ont souvent la capacité de contrôler

l'orientation métabolique de l'arginine. Il a en effet été montré que les NOS et les arginases, enzymes de synthèse du NO et de l'urée, étaient co-exprimées au niveau de l'endothélium vasculaire, ce qui favorise la compétition entre ces 2 voies d'utilisation de l'arginine, et conduit à une régulation de la synthèse de NO par les cellules endothéliales (54, 181). En outre, l'interaction entre les arginases et les NOS n'est pas toujours une simple question de compétition pour le substrat. La NOHA, qui rappelons-le est un intermédiaire dans la synthèse du NO, est un inhibiteur puissant des arginases (58), et des concentrations locales de NOHA, suffisantes pour inhiber l'activité de l'arginase, peuvent s'accumuler sous des conditions de taux élevés de synthèse de NO par iNOS, au moins en culture cellulaire (204). Cependant, parce que les seules données relatives à l'inhibition de l'arginase par la NOHA ont été obtenues *in vitro* dans des conditions non physiologiques, il est important de savoir si cette inhibition peut se produire également *in vivo*.

Bien que cela soit essentiel pour une compréhension complète du métabolisme de l'arginine, nous savons peu de choses des sources préférentielles (c.-à-d. synthèse endogène, renouvellement des protéines, ou absorption à partir du fluide extracellulaire) de l'arginine (ou des autres substrats) utilisées par les diverses enzymes métaboliques de l'arginine au sein des différents types cellulaires. Des preuves montrent que l'arginine synthétisée dans le cycle de l'urée n'est pas disponible pour la synthèse hépatique de NO (205). Pour compliquer encore ce schéma, des preuves récentes montrent que plusieurs pools d'arginine intracellulaires existent dans les cellules endothéliales, mais pas dans d'autres types cellulaires (182).

1.2.2. La voie arginase

La plus grande diversité de produits finaux provient du catabolisme de l'arginine par l'arginase (Figure 36). Comme nous l'avons vu précédemment, les arginases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'arginine en ornithine et en urée. Chez les mammifères, deux isoformes de l'arginase (arginases I et II) ont été identifiées. Ces deux isoformes sont les produits de deux gènes différents, diffèrent par leurs propriétés fonctionnelles, ainsi que par leur localisation tissulaire, cellulaire et subcellulaire, et par la régulation de leur expression (181). L'arginase I est une enzyme cytosolique et est retrouvée majoritairement dans le foie en tant que composant du cycle de l'urée et dans une moindre mesure dans quelques autres tissus (54, 181). Les niveaux élevés d'arginase I dans le foie, permettent d'assurer de façon efficace l'élimination des déchets azotés de l'organisme. L'arginase II, exprimée de façon constitutive, est une enzyme mitochondriale ubiquitaire et est exprimée, à des niveaux plus

faibles, dans les reins, le cerveau, l'intestin grêle, les glandes mammaires, les macrophages, et peu ou pas dans le foie (54, 181). Le devenir métabolique de l'ornithine est lié à la localisation intracellulaire des arginases. L'arginase I, colocalisée avec l'ornithine décarboxylase dans le cytosol, assure la synthèse des polyamines alors que l'arginase II, colocalisée avec l'ornithine aminotransférase dans la mitochondrie, assure la synthèse de la proline et du glutamate (181).

Les deux isoformes sont actives sous forme d'homotrimères. Leur activité dépend de la présence de deux atomes de manganèse (Mn) au site catalytique de l'enzyme. Ces atomes de manganèse vont permettre la fixation du substrat (l'arginine) puis son hydrolyse (54). En termes de cinétique enzymatique, les arginases ont une constante de dissociation (K_D) environ 100 fois plus grande pour leur substrat, l'arginine, que les NOS. Elles ont cependant une activité (V_{max}) également 1000 fois plus importante (54). On peut considérer que les arginases et les NOS ont environ la même vitesse de réaction avec l'arginine (54). De plus, le fait que la NOHA soit également un inhibiteur compétitif des arginases souligne les liens physiologiques qui existent entre arginases et NOS (58). Ainsi, les deux isoformes de l'arginase jouent un rôle clé dans la régulation de la plupart des aspects du métabolisme de l'arginine au niveau physiologique et physiopathologique.

Enfin, nous nous concentrerons ici sur l'expression des arginases dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. La plupart des arginases dans les vaisseaux sanguins sont présentes au niveau l'endothélium. Cependant, les cellules musculaires lisses vasculaires expriment un faible niveau d'arginase et l'expression de l'arginase dans ces cellules peut être induite par l'IL-4, l'IL-13, le TGF- β , la lysophosphatidylcholine et une contrainte mécanique (181). Dans les cellules musculaires lisses, l'arginase ne semble pas moduler la synthèse de NO mais semble plutôt impliquée dans la synthèse de polyamines et de proline pour la prolifération cellulaire et la synthèse du collagène, respectivement (181). Ainsi, l'expression élevée de l'arginase dans les cellules musculaires lisses est un facteur important dans le développement de l'hyperplasie intimale et de la rigidité vasculaire en réponse à une blessure ou au cours du vieillissement (181, 206).

Dans les cellules endothéliales, l'arginase est constitutivement exprimée, mais l'expression des isoformes varie selon les espèces de mammifères. Bien que certaines arginases I aient été détectées dans les cellules endothéliales humaines, l'isoforme prédominante est l'arginase II. Il existe des preuves solides que les niveaux constitutifs de l'activité arginase dans les cellules endothéliales limitent la synthèse de NO et ainsi la

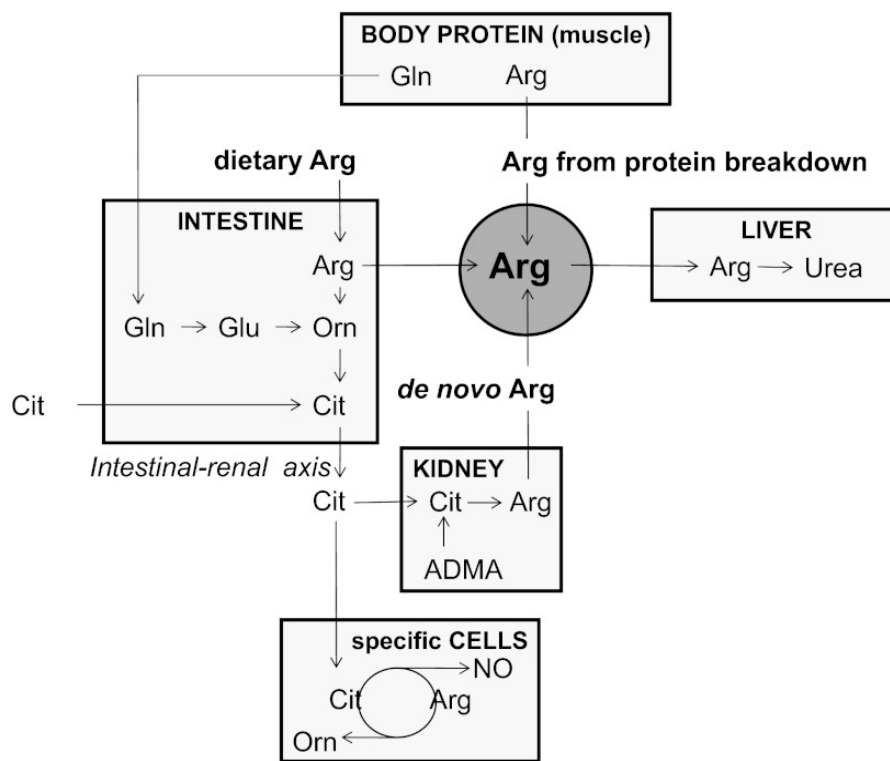


Figure 37 : Compartmentation du métabolisme de l'arginine au niveau corps entier

ARG : arginine, CIT : citrulline, GLN : glutamine, GLU : glutamate, ORN : ornithine, OTC : ornithine transcarbamylase. *D'après (184).*

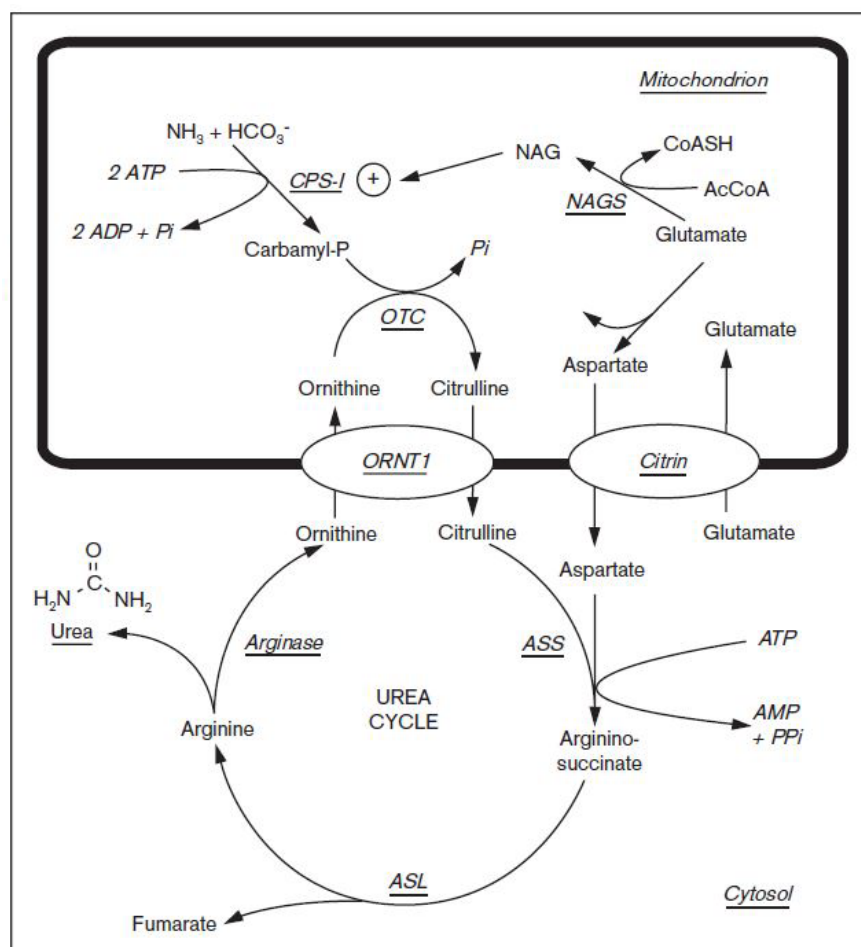


Figure 38 : Cycle de l'urée

AcCoA : Acetyl coenzyme A, ASL : argininosuccinate lyase, ASS : argininosuccinate synthetase, CoASH : coenzyme A, CPS-I : carbamyl phosphate synthetase I, NAG : N-acetylglutamate, NAGS : N-acetylglutamate synthetase, ORNT1 : mitochondrial ornithine:citrulline antiporter, OTC : ornithine transcarbamylase. *D'après (191).*

fonction vasodilatatrice NO-dépendante (181, 207, 208). Une large gamme d'agents est capable d'induire l'expression de l'arginase de cellules endothéliales en culture, tels que le lipopolysaccharide (LPS), le TNF- α , la thrombine, un taux élevé de glucose, les LDL oxydés et l' H_2O_2 (181). Enfin, les conditions dans lesquelles on retrouve une expression arginase endothéliale élevée *in vivo* comprennent l'hypertension (209), l'ischémie/reperfusion (210), l'hyperplasie intinale (211) et le vieillissement (207).

1.3. Compartimentation du métabolisme de l'arginine

Le métabolisme de l'arginine est hautement compartimenté en raison de l'expression dans différents organes, des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'arginine (Figure 37). Le foie est le seul organe faisant office d'exception, puisqu'il contient le cycle complet de l'urée (Figure 38) (182).

L'injection, en intraveineuse, d'arginine ^{15}N conduit à une moindre synthèse de $^{15}\text{NO}_3$ urinaires comparativement à l'administration en intra-gastrique, ce qui indique une importante compartimentation du métabolisme de l'arginine au niveau du corps entier (212). Par exemple, il existe une très faible captation d'arginine circulante par le foie (189), traduisant une séparation stricte des pools d'arginine hépatique et plasmatique. L'extraction splanchnique d'arginine en premier passage contribue à 16 % de la synthèse totale de NO (189). La synthèse de NO est quantitativement faible par rapport au flux d'arginine total. Elle correspondrait à environ 1 % du flux plasmatique d'arginine en condition normale chez l'homme (189, 196, 213). Certaines données suggèrent que la participation relative du pool plasmatique à la synthèse de NO, à partir de l'arginine alimentaire totale, est assez faible, autour de 2,1-2,8% (88, 196). Il semblerait donc que le pool d'arginine plasmatique contribue peu à la synthèse de NO. Cependant, le paradoxe de l'arginine, évoqué auparavant, met en avant que l'administration d'arginine orale, qui se traduit par une augmentation significative de l'arginine plasmatique, augmente la synthèse de NO. Ainsi, l'augmentation de l'arginine plasmatique serait plutôt un marqueur d'exposition plutôt que le « mécanisme » à l'origine de l'augmentation de la synthèse de NO. Dans ce sens, l'étude de Mariotti et *al.* met en évidence que l'arginine alimentaire est utilisée pour la synthèse de NO dans des pools qui sont cinétiquement séparés du pool plasmatique (196). Ceci renforce l'existence d'un degré élevé de l'utilisation compartimentée de l'arginine pour la synthèse de NO au niveau systémique (196). Dans la cellule endothéliale, eNOS est principalement localisée au niveau de l'appareil de Golgi périnucléaire et dans des micro-domaines de la membrane plasmique, incluant les cavéoles et les rafts lipidiques (182). eNOS a également été rapportée dans d'autres

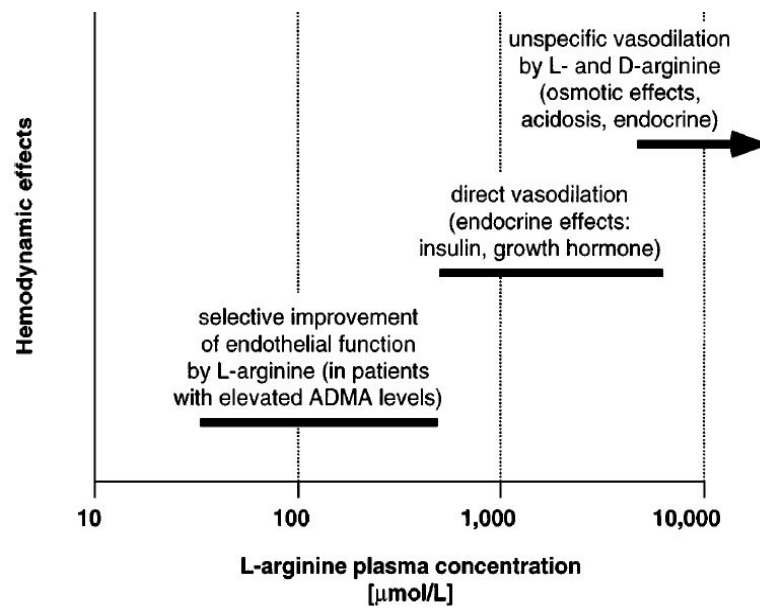


Figure 39 : Effets cliniques dose-dépendants de l'arginine chez l'Homme

D'après (222).

compartiments, tels que les mitochondries, le noyau et le cytosquelette (182). L'importance de la localisation de eNOS sur sa fonction et la libération de NO cellulaire a d'abord été démontré par des mutations qui empêchent à la fois la myristoylation et la palmitoylation, conduisant à une enzyme qui présente une capacité considérablement réduite à générer du NO dans des cellules intactes (182, 214). De plus, l'activité relative de eNOS varie en fonction de sa localisation intracellulaire, avec une activité plus élevée observée pour les eNOS localisées à la membrane plasmique, et une très faible activité dans le cytosol, le noyau et les mitochondries (182, 215). En plus de la localisation cellulaire et subcellulaire connue de l'arginine au sein de compartiments physiques spécifiques, une preuve a récemment montré qu'il existait au moins 2 pools subcellulaires cinétiquement distincts d'arginine pour les NOS des macrophages et des cellules endothéliales (182, 216). L'un de ces deux pools peut être épuisé par échange avec la lysine extracellulaire. Ce phénomène semble être spécifique du type cellulaire (216). Cependant les mécanismes qui maintiennent ces pools d'arginine et restreignent différenciellement la biodisponibilité en arginine pour les NOS et les autres enzymes du métabolisme de l'arginine ne sont pas connus. Il reste donc important de mieux comprendre l'importance fonctionnelle de la compartimentation du métabolisme de l'arginine, surtout au niveau de la régulation *in vivo*.

2. Rôles physiologiques de l'arginine

L'arginine, impliquée dans différentes voies métaboliques, exerce de nombreux rôles physiologiques, qui peuvent être dépendants ou indépendants du NO (Figure 39) (23, 217).

De nombreux effets de l'arginine sont ceux du NO lui-même : inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses, vasodilatation et inhibition de l'adhésion des monocytes et des plaquettes. L'effet anti-agrégant plaquettaire de l'arginine semble être dû à la production accrue de GMPc plaquettaire et l'inhibition de la formation de thromboxane B₂ (218). Cependant, l'arginine a un effet direct inhibiteur sur l'adhésion des leucocytes dans la matrice sous-endothéliale (23). De plus, elle stimule la fibrinogénolyse et la génération de plasmine (23, 219).

Son caractère basique peut influencer la dépolarisation membranaire des cellules endothéliales et induire ainsi une vasodilatation indépendante de l'endothélium ou encore réguler le pH intracellulaire. L'arginine possède des propriétés anti-oxydantes en piégeant l'anion superoxyde : elle limite ainsi la peroxydation lipidique (23). Elle serait également impliquée dans les variations de la viscosité du sang (220). L'arginine est aussi un précurseur des polyamines (putrescine, spermine, spermidine) qui sont importantes pour la prolifération

Tableau 2 : Effets NO-dépendants et indépendants de l'arginine

Actions vasculaires NO-dépendantes	Actions vasculaires NO-indépendantes
↑ relaxation des CML	↑ hyperpolarisation des CE
↑ prolifération des CE et angiogenèse	↑ pH intracellulaire et extracellulaire
↓ libération endothéline-1	↑ libération insuline, GH, glucagon, prolactine
↓ adhésion leucocytaire	↑ synthèse urée, créatine, proline et polyamines
↓ agrégation plaquettaire	↑ génération plasmine et fibrinogénolyse
↓ production superoxydes	↓ adhésion leucocytaire à la matrice non endothéliale
↓ expression molécules d'adhésion	↓ viscosité du sang
↓ expression facteurs chimiotactiques des monocytes	↓ activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
↓ prolifération des CML	↓ libération O_2^- et peroxydation lipidique
↓ apoptose des CE	↓ formation thromboxane B_2 , fibrine et fibrine plaquettaire

CE : cellules endothéliales, CML, cellules musculaires lisses, GH : hormone de croissance (growth hormone). *Modifié d'après (23).*

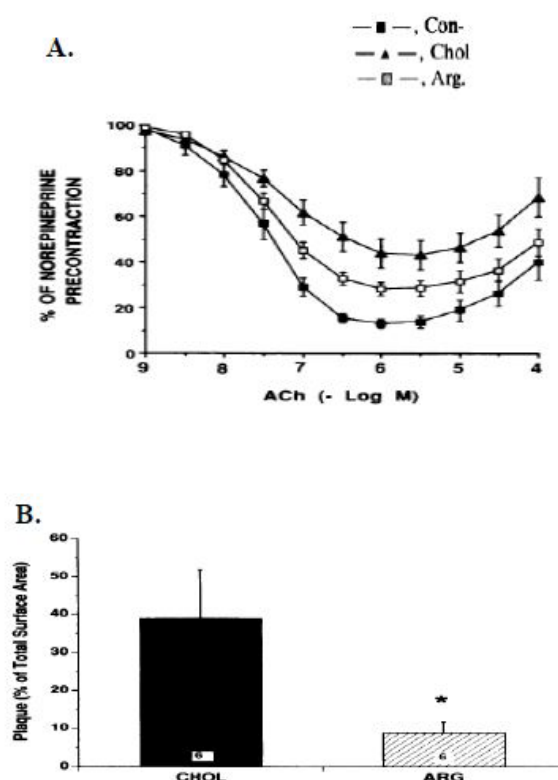


Figure 40: Effets d'une supplémentation en arginine sur la fonction endothéliale et la taille des lésions vasculaires chez des lapins hypercholestérolémiques

A : L'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante mesurée sur des segments d'aortes thoraciques de lapins hypercholestérolémiques (Chol) est significativement réduite lorsque que le régime hypercholestérolémiant est supplémenté en arginine (Arg, 2,25% dans l'eau de boisson pendant 10 semaines).

B : La taille des lésions vasculaires mesurée par planimétrie après un marquage au « red-oil O » est significativement réduite chez les lapins hypercholestérolémiques ayant reçu une supplémentation en arginine. *D'après (226).*

et la différenciation cellulaires, de la proline nécessaire à la synthèse de collagène pour la cicatrisation, de la créatine qui joue un rôle dans le métabolisme énergétique dans les muscles et les neurones (54, 184) et enfin de l'agmatine qui est à la fois un intermédiaire dans la synthèse des polyamines et une molécule neuromodulatrice (217). L'agmatine est aussi impliquée dans les phénomènes d'apoptose et de nécrose et peut également stimuler la libération d'insuline et de catécholamines (221). L'arginine intervient au niveau du cycle de l'urée pour la détoxification de l'ammoniac, en agissant comme activateur d'une enzyme clé du cycle, la N-acétylglutamate synthase (213). L'arginine exerce aussi un effet sécrétagogue vis-à-vis de l'hormone de croissance, de la prolactine, des catécholamines, du glucagon et de l'insuline (23, 217, 222). Les effets de ces hormones peuvent contribuer aux effets de l'arginine sur la fonction cardiovasculaire (223), l'insuline et le glucagon étant chacun des vasodilatateurs. Cependant, la sécrétion d'insuline liée à l'arginine ne peut pas être totalement dissociée de l'action du NO. En effet, l'effet de l'arginine sur la sécrétion d'insuline est partiellement dépendant du NO (224). À l'inverse, c'est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, accentuant l'effet hypotenseur induit par le NO (Tableau 2).

3. Apport en arginine et modulation de la dysfonction endothéliale

Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (y compris l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'hypertension, le diabète, l'obésité, la résistance à l'insuline et l'âge) peuvent faciliter le développement de l'athérosclérose, en partie en inhibant la synthèse endothéliale de NO. Ces observations suggèrent que des interventions visant à augmenter la synthèse de NO pourraient avoir une valeur thérapeutique dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires. Étant donné que l'arginine est le précurseur du NO, certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une supplémentation en L-arginine pourrait avoir un rôle thérapeutique.

Plusieurs études chez l'homme et l'animal ont montré que des perfusions d'arginine en intraveineuse induisaient des améliorations des fonctions vasculaires (225), mais nous nous contenterons de commenter ici les études ayant utilisé des doses orales en L-arginine. L'équipe de Cooke a été la première à démontrer que, sur un modèle animal d'athérosclérose, des lapins hypercholestérolémiques, une supplémentation en L-arginine, pendant 10 semaines, induisait une amélioration de la fonction endothéliale mesurée *ex-vivo*, et une réduction de la taille des lésions vasculaires (226) (Figure 40). De nombreuses autres études, sur le même modèle animal, ont confirmé et précisé cet effet bénéfique de l'arginine (227, 228). Ainsi, une réduction de la production de ROS et de l'activation endothéliale, de la vasodilatation NO-

dépendante, ainsi qu'une augmentation du ratio arginine/ADMA, considéré comme un marqueur de la biodisponibilité de l'arginine pour la synthèse du NO, ont été observées après des supplémentations orales en arginine chez l'animal (24, 213). Ces résultats ont largement encouragé les études d'intervention chez l'homme.

De nombreux essais de supplémentation, le plus souvent randomisés et en double-aveugle, chez des sujets sains, à risque cardiovasculaire (hypercholestérolémie, tabagisme, hypertension, diabète, obésité, résistance à l'insuline, et vieillissement) ou chez des patients présentant diverses maladies cardiovasculaires (maladies coronariennes, maladies artérielles périphériques, lésion d'ischémie/reperfusion, insuffisance cardiaque et dysfonction érectile) (23-25, 229), ont été publiées. Certains de ces troubles (hypercholestérolémie, tabagisme, maladies artérielles périphériques et coronariennes) manifestent une dysfonction endothéliale, qui répond clairement à l'administration d'arginine, alors que dans d'autres troubles (comme l'hypertension ou le diabète), le bénéfice de l'arginine est moins clair. Les doses d'arginine utilisées sont très importantes, le plus souvent très au-delà de ce qu'il est possible d'atteindre par l'alimentation. Un aspect particulier dans ces études de supplémentation est que les faibles doses d'arginine orale ont été récemment adoptées. Chez le sujet sain ou à risque, les données pour juger de l'intérêt de l'arginine à doses nutritionnelles sont moins nombreuses et restent assez contradictoires.

3.1. Supplémentation orale en arginine chez le sujet à risque

Hypercholestérolémie

Il y a une remarquable uniformité dans la littérature en ce qui concerne l'effet bénéfique de l'arginine chez les hypercholestérolémiques, bien que certaines études n'aient pas observé de réponse à l'arginine (167). Les études montrent le plus souvent un effet bénéfique de la L-arginine dans l'amélioration de la relaxation endothélium-dépendante chez les patients hypercholestérolémiques (230, 231). Clarkson *et al.* ont montré que 21 g/j d'arginine orale, pendant 4 semaines, doubleraient les concentrations plasmatiques d'arginine et amélioreraient significativement la FMD sans affecter les concentrations en lipides (232). Une supplémentation nutritionnelle d'une semaine sous forme de barres enrichies en arginine (6,6 g au total par jour) a également montré une amélioration de la FMD chez les sujets hypercholestérolémiques (231). Chez ces individus, la supplémentation orale en arginine réduit l'adhésion leucocytaire et normalise l'agrégation plaquettaire (233-235). Fait intéressant, la normalisation de l'agrégation plaquettaire persiste 2 semaines après l'arrêt de l'arginine (234). Plus récemment, il a été observé que l'adhésion des monocytes et des

Tableau 3 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets à risque cardiovasculaire : hypercholestérolémie et diabète

Référence	Dose totale d'arginine (g/jour)	Fréquence (nombre de fois/jour)	Durée de l'étude (jours)	Sujets	Protocole de l'étude	Résultats	Conclusion
<u>Hypercholestérolémie</u>							
Clarkson <i>et al.</i> 1996	21	3x7g	28	27 sujets hypercholestérolémiques	R, CP, DI, C	+ FMD	L'arginine orale améliore la FMD chez les jeunes adultes hypercholestérolémiques
Theillmeier <i>et al.</i> 1997	8,4	4x2,1g	14	10 sujets hypercholestérolémiques	R, CP, DI	- Adhésion des cellules mononucléaires	L'arginine orale diminue l'adhésion des cellules mononucléaires par l'intermédiaire de la voie du NO
Wolf <i>et al.</i> 1997	8,4	4x2,1g	14	23 sujets hypercholestérolémiques	R, CP, DI	- Agrégation plaquettaire	L'arginine orale atténue l'augmentation de la réactivité plaquettaire observée chez les patients hypercholestérolémiques
Chan <i>et al.</i> 2000	14 ou 21	3	84	24 sujets hypercholestérolémiques, 18 sujets témoins	R	+ Ratio arginine/ADMA normalisé - Adhésion monocytes, lymphocytes T + FMD	L'arginine orale restaure le ratio arginine/ADMA, ce qui normalise l'adhésion des cellules mononucléaires
Maxwell <i>et al.</i> 2000	6,6	2x3,3g	7	43 sujets hypercholestérolémiques	R, CP, DI	+ FMD	Des barres enrichies en arginine améliorent la FMD de sujets hypercholestérolémiques
Abdelhamed <i>et al.</i> 2003	6,6	2x3,3g	14	47 sujets hypercholestérolémiques	R, CP, DI	= FMD, agrégation plaquettaire, molécules d'adhésion (sélectine-E, sélectine-P)	L'arginine orale n'a pas d'effets favorables sur la FE ou plaquettaire chez des sujets hypercholestérolémiques
West <i>et al.</i> 2005	12	/	21	16 sujets hypercholestérolémiques	R, CP, C	= Résistance périphérique totale, insulínémie, glycémie, CRP, lipides - Pression artérielle diastolique, homocystéinémie, débit cardiaque	L'arginine orale améliore les réponses hémodynamiques au stress et réduit l'homocystéine plasmatique chez les sujets hypercholestérolémiques
<u>Diabète</u>							
Piatti <i>et al.</i> 2001	9	3x3g	30	12 patients atteints de diabète de type 2	R, CP, DI	+ GMPc, flux sanguin dans l'avant-bras, sensibilité hépatique et périphérique à l'insuline - PAS, synthèse endogène de glucose	L'arginine orale améliore mais ne normalise pas totalement la sensibilité hépatique et périphérique à l'insuline chez les patients atteints de diabète de type 2
Lucotti <i>et al.</i> 2006	8,3	/	21	33 patients obèses atteints de diabète de type 2 et insulino-résistants	R, CP, DI, P	+ GMPc, SOD, adiponectine, profil glucidique - ET-1, ratio leptine/adiponectine	L'arginine orale à long terme a un effet synergique avec l'exercice physique et un régime hypocalorique sur le métabolisme du glucose, la sensibilité à l'insuline, la FE, le stress oxydant et la libération d'adipokines chez les patients obèses atteints de diabète de type 2 et insulino-résistants

+ : amélioration, = : sans effet, - : diminution, C : croisé, CP : contrôlé par placebo, DI : double insu, ET-1 : endothéline-1, FE : fonction endothéliale, P : parallèle, PAS : pression artérielle systolique, R : randomisé, SOD : superoxyde dismutase.

lymphocytes T était atténuée par l'arginine (233). Chez le sujet hypercholestérolémique, une supplémentation en arginine à dose élevée (12 g/j) entraîne aussi des améliorations hémodynamiques au repos et en situation de stress, et réduit l'homocystéinémie (98) (Tableau 3).

Diabète

Peu d'études de supplémentation orale ont été réalisées chez des sujets diabétiques. Une étude a montré que l'arginine orale (9 g/j pendant 1 mois) augmentait le flux sanguin dans l'avant-bras et améliorait mais ne normalisait pas totalement la sensibilité hépatique et périphérique à l'insuline chez les patients atteints de diabète de type 2 (236). Une autre étude a mis en évidence que l'administration d'arginine orale, en association avec un régime hypocalorique et de l'exercice physique, améliore la fonction endothéliale, le stress oxydant, ainsi que le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline chez des patients obèses diabétiques de type 2 (Tableau 3).

Hypertension

La capacité de l'arginine à restaurer la dysfonction endothéliale dans ce cadre est controversée. La majorité des études avec l'arginine chez les patients hypertendus a révélé une absence d'effet de l'arginine sur la fonction endothéliale (par ex. (24, 25)). L'arginine orale (6 g/j) diminue la pression artérielle chez les personnes nouvellement diagnostiquées hypertendues au cours de la semaine de traitement (237), améliore la FMD de patients atteints d'hypertension essentielle lors d'une prise unique (238) et stimule la biosynthèse de NO, qui conduit à une diminution du stress oxydant chez des sujets atteints d'hypertension légère (239). La synthèse diminuée de NO dans certains types d'hypertension peut être causée par la réduction de l'expression de eNOS (240). Cela peut expliquer pourquoi la biodisponibilité accrue de substrat n'a aucun effet bénéfique dans le cadre de l'hypertension (Tableau 4).

Obésité/Résistance à l'insuline

Une étude a montré que l'arginine orale améliore la fonction endothéliale et le métabolisme du glucose, ainsi que la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline chez des sujets obèses avec un syndrome métabolique et une tolérance au glucose altérée (241) (Tableau 4).

Tabagisme

Chez des sujets sains, l'arginine orale à court terme prévient l'effet du tabagisme sur l'adhésion leucocytaire (242), augmente la FMD et abroge l'augmentation de la rigidité artérielle induite par le tabagisme (243, 244) (Tableau 4).

Age avancé

Tableau 4 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets à risque cardiovasculaire : hypertension, obésité/résistance à l’insuline, tabagisme et âge

Référence	Dose totale d’arginine (g/jour)	Fréquence (nombre de fois/jour)	Durée de l’étude (jours)	Sujets	Protocole de l’étude	Résultats	Conclusion
<u>Hypertension</u>							
Lekakis <i>et al.</i> 2002	6	1x6g	1	35 patients avec de l’hypertension essentielle	R, CP, DI	+ FMD	L’arginine orale augmente de façon aiguë la FMD chez des patients avec de l’hypertension essentielle.
Jablecka <i>et al.</i> 2012	6 12	3x2g 3x4g	28	35 patients avec de l’hypertension artérielle légère, 19 sujets sains témoins	R, CP, DI	+ Statut antioxydant	L’arginine orale stimule la biosynthèse de NO qui conduit à une diminution du stress oxydant
<u>Obésité/Résistance à l’insuline</u>							
Monti <i>et al.</i> 2013	6,6	2x3,3g	14	15 sujets obèses avec un syndrome métabolique et une tolérance au glucose altérée	R, CP, DI, C	+ NOx, GMPc, flux sanguin post-ischémique - Glucose circulant, ratio proinsuline/insuline	L’arginine orale améliore la FE et le métabolisme du glucose, la sensibilité à l’insuline et la sécrétion d’insuline chez des sujets obèses avec un syndrome métabolique et une tolérance au glucose altérée
<u>Tabagisme</u>							
Adams <i>et al.</i> 1997	7	1x7g		8 fumeurs, 8 témoins		= VCAM-1, sélectine-E - Adhésion monocytes, ICAM-1	L’augmentation de l’adhésion des monocytes à l’endothélium induite par la fumée de cigarette est réversible de façon aiguë par l’arginine orale
Siasos <i>et al.</i> 2007	6	1x6g	3	10 fumeurs sains	R, CP, DI, C	+ FMD (au 2 ^{ème} jour) - Rigidité artérielle (VOP, AI)	L’arginine orale à court terme améliore la performance artérielle des fumeurs sains et abroge l’augmentation de la rigidité artérielle induite par le tabagisme
Siasos <i>et al.</i> 2009	21	3x7g	3	12 jeunes fumeurs sains	R, CP, DI, C	+ FMD - VOP (rigidité artérielle), AI (réflexion d’onde), ICAM-1	L’arginine orale améliore la FE et les propriétés vasculaires élastiques de l’arbre artériel durant une phase aiguë de tabagisme chez de jeunes fumeurs sains
<u>Age</u>							
Bode-Böger <i>et al.</i> 2003	16	2x8g	14	12 sujets sains âgés	R, CP, DI, C	+ FMD, Ratio arginine/ADMA normalisé	L’arginine orale améliore la FE chez des sujets sains âgés, probablement par l’intermédiaire de la normalisation du ratio arginine/ADMA
Böger <i>et al.</i> 2007	3 (LP)	2x1,5g	21	28 sujets âgés sans symptômes cliniques	R, SI, C	+ FMD	L’arginine orale améliore la FE des sujets âgés sains avec des niveaux faibles ou élevés d’ADMA

+ : amélioration, = : sans effet, - : diminution, AI : augmentation index, C : croisé, CP : contrôlé par placebo, DI : double insu, FE : fonction endothéliale, LP : libération prolongée, NOx : nitrites + nitrates, R : randomisé, SI : simple insu, VOP : vitesse d’onde de pouls.

L'arginine orale améliore la fonction endothéliale chez des sujets sains âgés, probablement par l'intermédiaire de la normalisation du ratio arginine/ADMA (29, 245) (Tableau 4).

3.2. Supplémentation orale en arginine chez le sujet malade

En améliorant la synthèse de NO, en restaurant la vasodilatation et en inhibant la progression de l'athérosclérose, l'arginine constitue un bénéfice pour les patients souffrant de maladies cardiovasculaires. Ces maladies comprennent les maladies artérielles coronaires et périphériques, les lésions dues à l'ischémie/reperfusion et l'insuffisance cardiaque, qui sont toutes associées à une synthèse de NO altérée et à une dysfonction endothéliale (230). Par sa capacité à restaurer la fonction endothéliale vasodilatatrice, l'arginine peut augmenter le flux sanguin. Le résultat est une amélioration du flux coronarien chez les patients avec une maladie de l'artère coronaire, une amélioration des symptômes de claudication chez ceux avec une maladie artérielle périphériques, et une amélioration du statut fonctionnel chez ceux avec une insuffisance cardiaque.

Maladies artérielles coronaires

Il a été montré que l'administration d'arginine orale améliore la fonction endothéliale, la fonction cardiovasculaire et la qualité de vie, augmente la capacité d'exercice et réduit l'ischémie myocardique chez des patients atteints de coronaropathie (133, 246-249). En outre, l'arginine orale (21 g/j pendant 3 jours) améliore la FMD et inhibe l'adhésion leucocytaire chez des hommes jeunes avec une maladie coronarienne (250). De façon frappante, 6 mois de supplémentation orale en arginine (9 g/j) diminuent les concentrations plasmatiques d'ET-1 de 30%, augmente la réponse du flux sanguin coronaire à l'acétylcholine de 150%, et améliore la FMD chez les patients avec une maladie coronarienne non obstructive (251).

En revanche, plusieurs études cliniques ont échoué à montrer des effets bénéfiques de l'arginine sur la fonction vasculaire (252, 253). Une supplémentation orale en arginine (15 g/j) améliore la réponse vasodilatatrice de l'avant-bras à l'acétylcholine chez les patients souffrant d'angine stable mais n'a pas d'effet sur le stress oxydant et la capacité d'exercice (253). Dans une étude incluant 30 patients atteints de coronaropathie stable, Blum *et al.* n'ont pas constaté d'amélioration significative de la vasodilatation endothélium-dépendante, du flux sanguin, ou des taux sériques de marqueurs inflammatoires avec l'arginine orale (9 g/j pendant 1 mois). Les sujets de l'étude avaient un traitement cardiovasculaire complet, avec des statines et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, qui tous deux sont connus pour améliorer la fonction endothéliale. En outre, les bêtabloquants et l'aspirine

Tableau 5 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets malades : maladies des artères coronaires

Référence	Dose totale d'arginine (g/jour)	Fréquence (nombre de fois/jour)	Durée de l'étude (jours)	Sujets	Protocole de l'étude	Résultats	Conclusion
<i>Maladies des artères coronaires</i>							
Adams <i>et al.</i> 1997	21	3x7g	3	10 hommes avec une MAC	R, CP, C	+ FMD - Adhésion monocytes	Chez les jeunes hommes présentant une MAC, l'arginine orale améliore la FMD et diminue l'adhésion des monocytes à l'endothélium
Ceremuzynski <i>et al.</i> 1997	6	3x2g	3	22 patients avec une MAC (angine de poitrine stable)	R, CP, DI	+ Capacité d'exercice	L'arginine orale a un effet bénéfique sur la capacité d'exercice des patients avec une angine de poitrine stable
Lerman <i>et al.</i> 1998	9	3x3g	180	26 patients avec un MAC non obstructive	R, CP, DI	+ Flux coronarien, scores de symptôme - ET-1	L'arginine orale à long terme améliore la FE des petits vaisseaux coronaires, améliore les symptômes et diminue l'ET-1 plasmatique
Blum <i>et al.</i> 2000	9	3x3g	30	29 hommes et 1 femme avec une MAC	R, CP, DI, C	= NO sérique, FMD, molécules d'adhésion (sélectine-E, ICAM-1, VCAM-1)	L'arginine orale n'améliore pas la biodisponibilité en NO chez les patients avec une MAC ayant un traitement approprié
Walker <i>et al.</i> 2001	15	3x5g	14	40 hommes avec une angine de poitrine stable	R, CP, DI, P	+ Ratio arginine/ADMA = Vasodilatation endothélium-dépendante à l'Ach, stress oxydant, capacité exercice	Chez les hommes avec une angine stable, une augmentation du ratio arginine/ADMA avec la supplémentation orale en arginine n'est pas associée à une amélioration de la vasodilatation endothélium-dépendante, du stress oxydant ou de la performance d'exercice
Maxwell <i>et al.</i> 2002	6,6	2x3,3g	14	36 patients avec une MAC stable	R, CP, DI, C	+ FMD, exercice, qualité de vie	L'arginine orale, conjointement à une thérapie classique, améliore la fonction vasculaire, la capacité d'exercice et la qualité de vie des patients avec une MAC stable
Yin <i>et al.</i> 2005	10	2x5g	28	31 sujets avec une MAC stable	R, C	+ FMD = Marqueurs inflammatoires - Oxydation LDL	L'arginine orale améliore la FE et réduit l'oxydation des LDL chez les patients avec une MAC
Lucotti <i>et al.</i> 2009	6,4	2x3,2g	180	32 patients non diabétiques avec une MAC stable	R, CP, DI	+ Ratio Arginine/ADMA, GMPc, hyperémie réactive, sensibilité à l'insuline, adiponectine - ADMA, IL-6, MCP-1	L'arginine orale semble avoir des avantages anti-inflammatoires et métaboliques chez les patients non diabétiques avec une MAC stable

+ : amélioration, = : sans effet, - : diminution, Ach : acétylcholine, C : croisé, CP : contrôlé par placebo, DI : double insu, FE : fonction endothéliale, MAC : maladie des artères coronaires, P : parallèle, R : randomisé.

comme antioxydants étaient utilisés. Cela peut avoir entraîné un biais de confusion avec les effets possibles de l'arginine (Tableau 5).

Maladies artérielles périphériques

La consommation quotidienne orale de barres enrichies en arginine (6,6 g/j) pendant 2 semaines augmente la distance totale de marche et sans douleur de 23 et 66%, respectivement, ainsi que la qualité de vie des patients avec une maladie artérielle périphérique (254). L'arginine orale améliore aussi la fonction endothéliale chez les patients atteints de maladie artérielle périphérique occlusive et d'hyperhomocystéinémie (255) et augmente les concentrations en NO et le statut oxydant, suggérant un effet antioxydant indirect chez des sujets avec une maladie artérielle périphérique et un diabète de type 2 (239).

En revanche une étude a montré que chez des patients avec une maladie artérielle périphérique, l'arginine orale à long terme (3 g/j pendant 6 mois) ne semble pas avoir d'effet sur la synthèse de NO ou améliorer la réactivité vasculaire (256) (Tableau 6).

Insuffisance cardiaque

Il y a des preuves croissantes indiquant que l'administration orale d'arginine améliore la réponse du flux sanguin à l'acétylcholine, diminue la résistance vasculaire systémique et la pression artérielle moyenne, et augmente le volume d'éjection ventriculaire et le débit cardiaque (230). Par exemple, 6 semaines d'arginine orale (5,6-12,6 g/j) diminue les concentrations plasmatiques d'ET-1, augmente le flux sanguin en réponse à l'exercice, et améliore la compliance artérielle et le statut fonctionnel global (257). De même, 4 semaines d'arginine orale (8 g/j) améliorent la vasodilatation endothélium-dépendante chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, et cet effet bénéfique s'additionne à celui de l'exercice (258). Enfin la supplémentation orale en arginine améliore l'hémodynamique rénale chez les insuffisants cardiaques (259) et améliore la capacité d'exercice chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque stable (260).

En revanche, en présence d'une insuffisance cardiaque chronique, Chin-Dusting *et al.* n'ont pas obtenu de résultat avec 20 g/j d'arginine pendant 28 jours (261) (Tableau 6).

3.3. Supplémentation orale en arginine chez le sujet sain

Chez des sujets sains, Adams *et al.* ont montré un effet positif de l'arginine sur l'agrégation plaquettaire et la FMD (26). Cependant, chez la femme post-ménopausée, une supplémentation de 9 g/j d'arginine ne semble pas augmenter la synthèse de NO et ne s'accompagne d'aucune amélioration de la fonction endothéliale ou de l'expression des adhésines (27). Signalons que, chez l'homme sain, deux études avaient déjà rapporté

Tableau 6 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets malades : maladies des artères périphériques et insuffisance cardiaque

Référence	Dose totale d'arginine (g/jour)	Fréquence (nombre de fois/jour)	Durée de l'étude (jours)	Sujets	Protocole de l'étude	Résultats	Conclusion
<i>Maladies des artères périphériques</i>							
Maxwell <i>et al.</i> 2000	6,6	2x3,3g	14	41 patients avec une MAP (claudication)	R, CP, DI	+ Distance de marche sans douleur, qualité de vie	Des barres enrichies en arginine améliorent la distance de marche sans douleur ainsi que la qualité de vie de patients avec une MAP
Sydow <i>et al.</i> 2003	24	3x8g	56	27 patients avec une MAP occlusive et de l'hyperhomocystéinémie	R, CP, DI	+FMD - Stress oxydant (β-iso-PGF2α)	L'arginine orale améliore la FE chez les patients atteints de MAP occlusive avec de l'hyperhomocystéinémie
Wilson <i>et al.</i> 2007	3	3x1g	180	66 sujets avec une MAP	R, CP, DI	= Compliance vasculaire - FMD	Chez les patients avec une MAP, l'arginine orale à long terme n'augmente pas la synthèse de NO, n'améliore pas la réactivité vasculaire
Jablecka <i>et al.</i> 2012	6	3x2g	60	38 patients avec une MAP et un diabète de type 2, 12 sujets sains	/	+ NO, statut antioxydant	L'arginine orale augmente les concentrations en NO et le statut oxydant, suggérant un effet antioxydant indirecte
<i>Insuffisance cardiaque</i>							
Chin-Dusting <i>et al.</i> 1996	20	1x20g	28	20 patients avec une IC chronique	R, CP, DI	= Flux sanguin de l'avant-bras	L'arginine orale n'améliore pas la FE des sujets présentant une IC chronique
Rector <i>et al.</i> 1996	5,6 12,6	2x2,8g 3x4,2g	42	15 patients avec une IC	R, CP, DI	+ Flux sanguin de l'avant-bras, compliance artérielle, statut fonctionnel - ET-1	L'arginine orale est bénéfique chez les patients avec une IC
Hambrecht <i>et al.</i> 2000	8	3g+2g+3g	28	40 patients avec une IC chronique	R	+ Dilatation de l'artère brachiale en réponse à l'Ach	L'arginine orale aussi bien que l'exercice améliore la dilatation endothéliale dépendante induite par un agoniste. Les deux interventions couplées ont un effet synergique
Watanabe <i>et al.</i> 2000	15	3x5g	5	17 patients avec une IC chronique	R, CP, DI, C	+ Excrétion GMPc, clairance créatinine, flux sanguin rénal, filtration glomérulaire - ET-1	L'arginine orale a des effets bénéfiques sur le taux de filtration glomérulaire, la natriurèse, et le niveau d'ET-1 plasmatique chez les patients atteints d'IC congestive chronique
Bednarz <i>et al.</i> 2004	9	/	7	21 patients avec une IC chronique	R, CP, DI, C	+ Durée d'exercice = Stress oxydant	Chez les patients avec une IC chronique stable, l'arginine orale améliore la durée d'exercice qui peut être due à une vasodilatation périphérique NO-induite

+ : amélioration, = : sans effet, - : diminution, Ach : acétylcholine, C : croisé, CP : contrôlé par placebo, DI : double insu, FE : fonction endothéliale, IC : insuffisance cardiaque, MAP : maladie des artères périphériques, R : randomisé.

l'absence d'effet d'une supplémentation à forte dose (20-21 g/j) sur la fonction vasculaire endothélium-dépendante (26, 262). En revanche, chez le sujet sain, une supplémentation en arginine par voie diététique (+ 6 g) ou par complément (+ 10 g) réduit la pression artérielle (28). En outre, chez le sujet sain, la supplémentation en arginine orale réduit la dysfonction endothéliale induite par un repas riche en lipides (178, 179, 263). Une étude suggère une augmentation immédiate, mais non significative, de la synthèse de NO et de l'activation du signal GMPc chez le sujet sain après ingestion de 6 g d'arginine, et sans effet sur les paramètres hémodynamiques (193). Chez le volontaire sain, un supplément de 3 g d'arginine à un mélange équilibré d'acides aminés n'affecte pas la fonction endothéliale, mais tend paradoxalement à réduire de façon transitoire la réactivité des muscles lisses de l'artère brachiale dans la période postprandiale (264). Au final, les bénéfices d'un apport supplémentaire en arginine chez le sujet sain, quant à la synthèse de NO et ses répercussions fonctionnelles, restent difficiles à évaluer (Tableau 7).

La synthèse de ces résultats est limitée par l'hétérogénéité importante des contextes cliniques et des critères de jugement de ces études, la faiblesse des effectifs (10 à 60 sujets), la diversité des doses administrées (2 à 4 fois la consommation usuelle) et de la durée de supplémentation (dose unique à 6 mois). Certaines grandes tendances semblent néanmoins pouvoir être dégagées. On constate ainsi :

- une amélioration de la vasodilatation endothélium-dépendante mesurée au niveau périphérique. En revanche, aucun effet n'est observé sur la vasodilatation endothélium-indépendante;
- une amélioration de la tolérance à l'exercice physique, en particulier chez les sujets présentant une angine de poitrine;
- une diminution de l'adhésion leucocytaire et plaquettaire à l'endothélium;
- et enfin, quoique de manière hétérogène, une amélioration des valeurs de pression artérielle.

3.4. L'arginine orale : un bénéfice mais pour quel type de population ?

Contrairement à l'animal, les bénéfices de l'arginine chez l'Homme ont été plus discutés (23, 24, 180, 265). En effet, de très nombreuses études chez des sujets atteints de maladies athérothrombotiques ou à risque cardiovasculaire, ont rapporté une amélioration de la vasodilatation-dépendante de l'endothélium après une supplémentation en L-arginine, pendant des périodes variant de 3 jours à 1 mois (23, 25, 229, 232). Des effets bénéfiques ont été

Tableau 7 : Supplémentations orales en arginine chez les sujets sains

Référence	Dose totale d'arginine (g/jour)	Fréquence (nombre de fois/jour)	Durée de l'étude (jours)	Sujets	Protocole de l'étude	Résultats	Conclusion
<i>A jeun</i>							
Adams <i>et al.</i> 1995	21	3x7g	3	12 jeunes hommes sains	R, CP, DI, C	+ GMPc plaquettaire = FMD, synthèse NO - Agrégation plaquettaire	Chez les jeunes hommes adultes sains, l'arginine orale inhibe l'agrégation plaquettaire par l'intermédiaire de la voie du NO
Chin-Dusting <i>et al.</i> 1996	20	1x20g	28	26 sujets sains	R, CP, DI	= Flux sanguin de l'avant-bras	L'arginine orale n'affecte pas les FE chez des sujets sains
Bode-Böger <i>et al.</i> 1998	6	1x6g	5	8 hommes sains	R, CP, DI, C	= Résistance périphérique, pression artérielle, excrétion GMPc et nitrates	L'arginine orale n'a pas d'effets sur les paramètres hémodynamiques chez des sujets sains
Blum <i>et al.</i> 2000	9	3x3g	30	10 femmes post-ménopausées	R, CP, DI, C	= NO sérique, FMD, molécules d'adhésion (sélectine-E, ICAM-1, VCAM-1)	L'arginine orale n'augmente pas la synthèse endothéliale et la libération de NO
Siani <i>et al.</i> 2000	6 ou 10	/	7	6 sujets sains	R, CP, SI, C	+ clairance créatinine - Pression artérielle, glycémie	Une augmentation modérée en arginine orale réduit de manière significative la pression artérielle et affecte la fonction rénale et le métabolisme des glucides chez des volontaires sains
Mariotti <i>et al.</i> 2007	3	1x3g	1	9 hommes sains	R, CP, DI, C	+ NO synthétisé = ICAM-1, facteur von Willebrand, GMPc, VOP, compliance artérielle - FMD	Chez des hommes sains, le repas d'acides aminés contenant de l'arginine est le seul à affecter la voie NO. De façon inattendue, l'arginine peut de façon aigue diminuer la réactivité des CML à la libération de NO
<i>En période postprandiale</i>							
Marchesi <i>et al.</i> 2001	6	3x2g	10	7 hommes sains	NA	+ FMD postprandiale	La DE postprandiale est en partie atténuée par l'arginine orale chez des sujets sains.
Lin <i>et al.</i> 2008	15	1x15g	1	40 jeunes hommes sains	R, CP	+ FMD postprandiale = Sélectine-P, facteur von Willebrand postprandiaux	L'arginine orale atténue la DE et le stress oxydant induit par l'hypertriglycémie postprandiale
Borucki <i>et al.</i> 2009	2,5	1x2,5g	1	15 sujets sains	R, CP, C	+ FMD postprandiale	L'arginine orale est capable de prévenir une DE lipémique

+ : amélioration, = : sans effet, - : diminution, C : croisé, CML : cellules musculaires lisses, CP : contrôlé par placebo, DE, dysfonction endothéliale, DI : double insu, FE : fonction endothéliale, R : randomisé, VOP : vitesse d'onde poul.

observés aussi bien à de fortes doses en arginine (9-24 g/j) que pour de plus faibles doses (3-8 g/j) (23-25, 229). Comme chez l'animal, d'autres études ont rapporté un effet bénéfique de l'arginine sur les autres paramètres de la dysfonction endothéliale, tels que sur l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1), le GMPc plaquettaire ou le rapport arginine/ADMA (23-25, 229). Cependant, plusieurs études n'ont observé aucun effet bénéfique de l'arginine sur la fonction endothéliale (24, 25, 265). L'une des premières explications est venue du fait que plusieurs de ces études négatives ont été réalisées chez des sujets sains (27, 262, 264). Très récemment, une méta-analyse a démontré que des supplémentations en arginine, quelle que soit la dose, amélioreraient la FMD à jeun lorsque celle-ci était faible, c.-à-d. lorsque la fonction endothéliale est altérée (30). C'est ainsi qu'il a été supposé que des supplémentations en arginine seraient plus utiles, et donc plus efficaces, chez des sujets manifestant déjà une dysfonction endothéliale. Malgré la plausibilité de cette hypothèse, une très grande réserve concernant la supplémentation en arginine est venue d'une étude montrant une absence d'effet de l'arginine à fortes doses (20 g/j pendant 6 mois), observée chez des sujets atteints de maladies coronariennes dont la vasodilatation endothéliale était altérée (261). De plus, des données plus récentes suggèrent qu'une supplémentation chronique à long terme offre peu d'avantages et pourrait être nocive (256). Les raisons de ceci ne sont pas bien comprises et sont susceptibles d'être nombreuses. L'exposition chronique à des niveaux élevés de NO pourrait désensibiliser la voie de signalisation du NO, nuire au transport de l'arginine et augmenter les lésions vasculaires et la mortalité (266, 267). Une supplémentation chronique en arginine peut également influencer d'autres voies, incluant une plus grande activation de iNOS (268) qui, contrairement à eNOS, est principalement limitée par la biodisponibilité en substrat, et une augmentation de l'expression et de l'activité catalytique des arginases en raison de leur K_m plus élevé. Une conséquence de l'activité accrue de l'arginase est, la synthèse d'ornithine et l'élévation attenante de la synthèse de proline et de polyamines qui peuvent favoriser la prolifération cellulaire et le remodelage vasculaire (269). En outre, récemment, une étude d'intervention à grande échelle, chez 153 sujets ayant développé un infarctus du myocarde, a montré qu'un taux de mortalité plus important était observé chez des patients ayant reçu une supplémentation en arginine (9 g/j), en même temps que leur traitement post-infarctus, par rapport à des sujets ayant reçu le traitement plus un placebo (270). Cette étude suggère ainsi que, dans certaines situations, l'arginine pourrait au contraire avoir un effet délétère drastique sur la fonction vasculaire. Il a été suggéré que, dans certaines situations extrêmement délétères, tels l'infarctus du myocarde, où les concentrations en BH_4 et en arginine seraient très limitantes, la supplémentation en arginine aurait plutôt tendance à

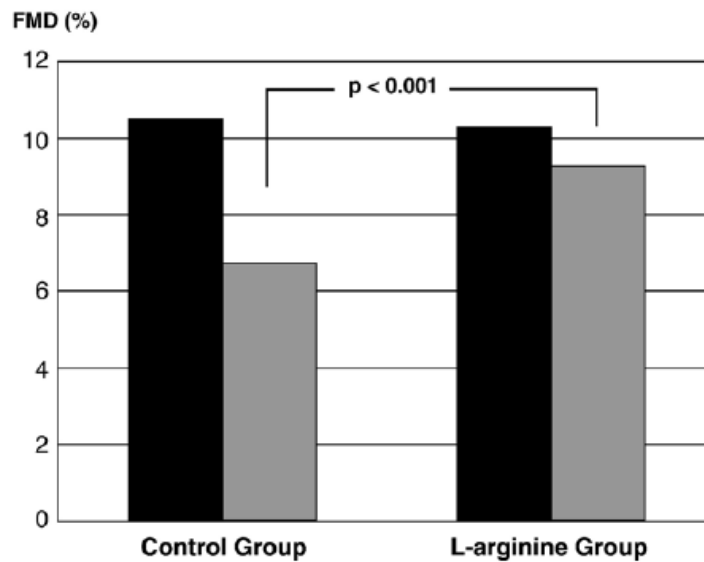


Figure 41 : L'ingestion de 15g d'arginine atténue la dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas hyperlipidique

L'altération de la FMD observée chez des sujets sains, 2 h après l'ingestion d'un repas hyperlipidique (barres grises, 900 kcal, 50 g de lipides) par rapport à la FMD mesurée à jeun (barres noires), est significativement réduite lorsque que le repas hyperlipidique est supplémenté par une dose de 15 g d'arginine. *D'après (179).*

amplifier encore davantage le découplage de eNOS et le stress nitrosant (270, 271). Cette hypothèse reste à confirmer par d'autres études ciblant plus spécifiquement la voie de synthèse du NO lors de supplémentation en L-arginine, à différents stades de l'athérosclérose.

Prises ensemble, ces études cliniques suggèrent qu'il peut y avoir des sous-groupes de sujets dont la fonction vasculaire est améliorée par une supplémentation en arginine, mais qu'il y a d'autres sujets ou sous-groupes de sujets qui ne profiteraient pas d'une telle intervention nutritionnelle. Récemment, il est devenu clair que les niveaux endogènes d'ADMA peuvent déterminer la réponse d'un sujet à une supplémentation en arginine. En effet, l'arginine semble n'exercer aucun effet chez les sujets ayant des niveaux faibles d'ADMA, alors que chez les sujets ayant des niveaux élevés d'ADMA, l'arginine normalise le ratio arginine/ADMA ainsi que la fonction endothéliale (245). De plus, de nombreuses études de supplémentation en arginine orale ont montré une fonction endothéliale améliorée chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie, qui est connue pour augmenter l'ADMA (233). Ainsi, des marqueurs de diagnostic sont nécessaires pour permettre l'identification prospective de sujets qui ont une forte probabilité de répondre favorablement à une supplémentation en arginine. En plus de la dose d'arginine (des doses quotidiennes inférieures à 2-3 g/j semblent être sans effet bénéfique), la sélection des sujets semble être un facteur majeur affectant le résultat de l'étude. Enfin, de façon très intéressante, certaines études ont mis en évidence les effets bénéfiques de l'arginine à court/moyen terme, à dose nutritionnelle, dans un contexte de stress nutritionnel. Il a été montré que la supplémentation en L-arginine à dose nutritionnelle (6 g/j pendant 10 jours) améliorait l'altération postprandiale de la FMD induite par un repas hyperlipidique (263). Ce résultat a été confirmé dernièrement en aigu, où l'ingestion d'une dose unique de 15 g en arginine (Figure 41), réduisait l'altération postprandiale de la fonction endothéliale et aussi le stress oxydant postprandial (179). L'essentiel du corpus scientifique a été obtenu en situation de risque ou de maladie, et à des niveaux d'apport en arginine supérieur aux doses nutritionnelles. Au final, comme la situation postprandiale crée temporairement une situation mimant celle de sujets à risque ou malade, impliquant du stress oxydant, on peut faire l'hypothèse que l'apport en arginine pendant le repas pourrait avoir des répercussions sur l'ampleur des phénomènes délétères postprandiaux, et notamment les phénomènes inflammatoires, systémiques et vasculaires. La situation postprandiale constituerait ainsi, probablement, une situation métabolique au cours de laquelle l'arginine pourrait avoir un effet bénéfique sur la fonction endothéliale vasculaire. Il reste toutefois indispensable d'évaluer l'efficacité de la supplémentation en L-arginine et de préciser le

contexte clinique des patients à traiter dans le cadre d'essais thérapeutiques portant sur de larges échantillons de sujets rigoureusement caractérisés.

4. Mécanismes d'action des effets bénéfiques de l'arginine exogène sur les fonctions associées au NO : paradoxe de l'arginine

La capacité effective d'un apport exogène en arginine à moduler la production du NO a été l'objet d'une polémique (272). En effet, les concentrations intracellulaires en arginine sont de l'ordre de 0,5-3 mM dans des cellules endothéliales fraîchement isolées et des biochimistes ont très tôt montré que le K_m de la eNOS purifiée était de 2,9 μM (23, 54), ce qui suggérerait qu'un apport exogène en arginine serait a priori inefficace, puisqu'à des niveaux normaux de concentrations intracellulaires, l'enzyme fonctionnerait déjà à une vitesse maximale. Cependant, l'augmentation des concentrations extracellulaires en arginine de 0,1 à 10 mM, augmente de manière dose-dépendante la synthèse de NO par les cellules endothéliales cultivées (23). De plus, force a été de constater que l'administration d'arginine, chez des sujets à risque ou malades, améliorait les fonctions associées au NO. Ce paradoxe a été baptisé « paradoxe de l'arginine ». Un certain nombre de théories ont été proposées pour expliquer ce paradoxe de l'arginine, y compris la colocalisation du transporteur de l'arginine CAT-1 et de eNOS dans les cavéoles associées à la membrane, la compartimentation intracellulaire de l'arginine, l'inhibition compétitive de eNOS par des inhibiteurs endogènes (par ex. l'ADMA), l'équilibre entre activité de l'arginase et celle de la eNOS ou encore des altérations dans la dimérisation de eNOS (23, 182, 222).

4.1. Colocalisation de CAT-1 et eNOS et compartimentation intracellulaire

Un certain nombre de transporteurs transmembranaires existent au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales et interviennent notamment dans le système de transport y^+ de l'arginine. Les principaux transporteurs sont CAT-1 et CAT-2B (182). McDonald et ses collègues (273) ont démontré que CAT-1, responsable de 60 à 70 % du passage de l'arginine dans la cellule endothéliale, est colocalisé avec eNOS associée à la membrane au sein des cavéoles. La présence de CAT-1 et de eNOS dans les cavéoles et la capacité de l'arginine extracellulaire à stimuler la libération de NO dans les cellules ayant des concentrations intracellulaires abondantes en arginine ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'arginine existerait dans des compartiments subcellulaires peu interchangeable. En effet, une fois transportée dans la cellule endothéliale, l'arginine pourrait ne plus accéder aux eNOS associées à la membrane (274). La concentration en arginine dans un tel micro-environnement

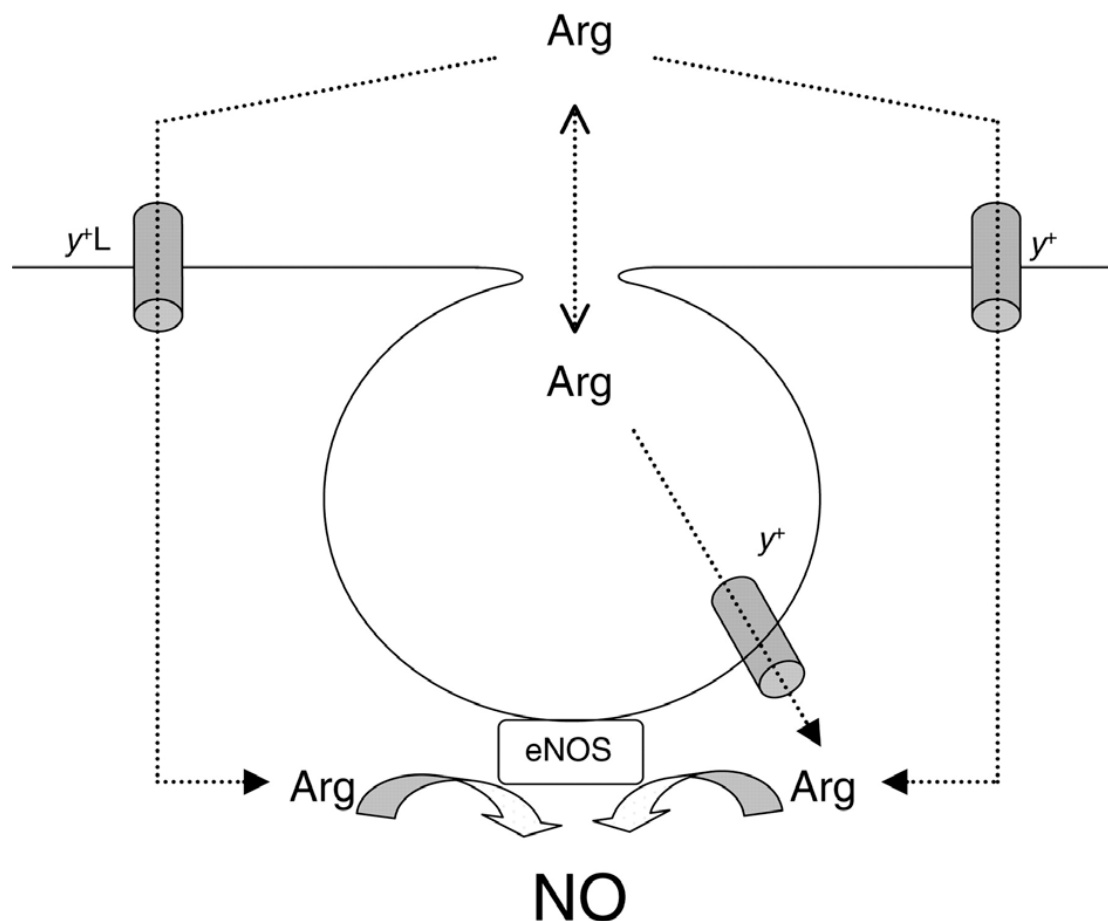


Figure 42 : Colocalisation de eNOS et CAT-1 au sein des cavéoles

D'après (402).

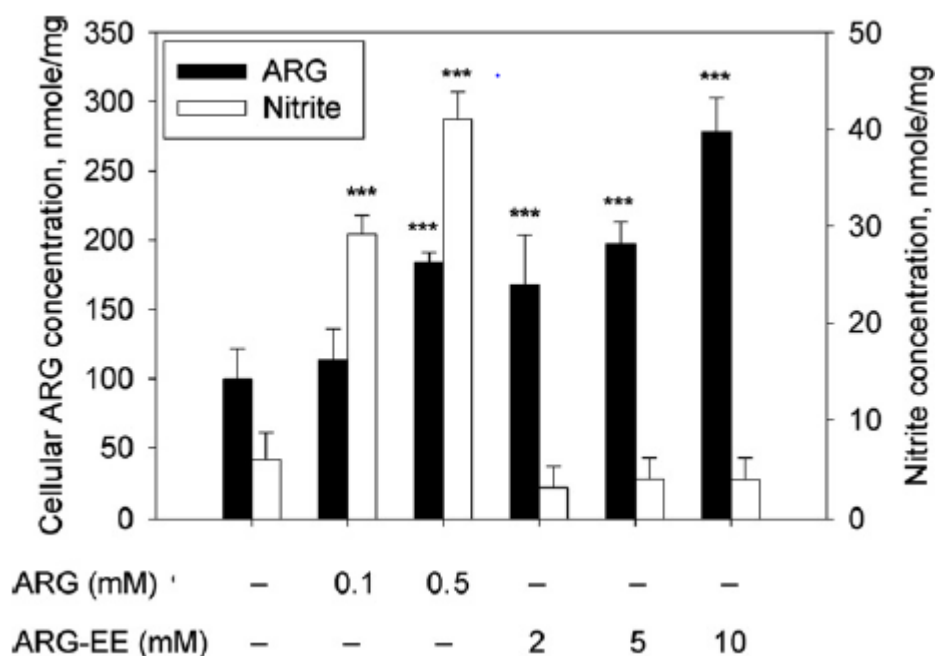


Figure 43 : Utilisation préférentielle de l'arginine extracellulaire pour la synthèse de NO

Effets d'un apport en arginine (ARG) et en arginine ethyl ester (qui peut augmenter l'arginine intracellulaire par l'intermédiaire d'une diffusion passive plutôt qu'un transport actif par CAT-1, ARG-EE) sur les concentrations d'arginine intracellulaire (barres noires) et de nitrites (barres blanches) après l'incubation de cellules endothéliales avec différentes concentrations d'ARG et d'ARG-EE pendant 2 h. L'arginine extracellulaire, par l'intermédiaire de son transport actif, est préférentiellement utilisée pour la synthèse de NO par les cellules endothéliales humaines. *D'après (274).*

protégé pourrait être différente de celle de la cellule entière (273) et il est difficile de savoir comment une supplémentation en arginine pourrait spécifiquement affecter les concentrations cavéolaires. Cependant, l'association étroite de eNOS et de CAT-1 avec la membrane cellulaire suggère un mécanisme pour la délivrance directe de l'arginine extracellulaire à eNOS, sans la mélanger avec le pool intracellulaire total, niant l'importance des concentrations d'arginine intracellulaires (Figure 42). Ainsi, l'arginine extracellulaire pourrait être préférentiellement utilisée par eNOS dans ce microenvironnement. Ceci est confirmé avec des observations *in vitro* qui montrent que l'arginine extracellulaire, plutôt que l'arginine intracellulaire, est le principal facteur déterminant pour la synthèse de NO dans les cellules endothéliales (274) (Figure 43). Dans ce paradigme, les concentrations d'arginine extracellulaires détermineraient le taux de transport et la biodisponibilité de l'arginine pour eNOS. Par conséquent, des concentrations plasmatiques d'arginine en baisse ainsi qu'une activité de CAT-1 en baisse deviennent des mécanismes potentiels limitant davantage les taux de synthèse de NO dans des états pathologiques. Bien qu'il existe des données suggérant l'existence de ces pools (182, 216), une preuve directe de leur existence, ainsi qu'un mécanisme de séquestration de l'arginine sont encore manquants.

4.2. Inhibition compétitive par des inhibiteurs endogènes

Une autre explication pour le paradoxe de l'arginine peut être la présence d'analogues endogènes de l'arginine, l'ADMA et la N^G -monométhyl-L-arginine (L-NMMA), qui exercent une activité biologique par inhibition compétitive de la NOS (225, 275, 276). La L-NMMA provoque une dysfonction endothéliale dans les modèles animaux et humains (78). Les concentrations plasmatiques d'ADMA sont 10 fois supérieures à celles du L-NMMA chez l'Homme (276), et sont élevées chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (277), entraînant une altération de la synthèse de NO dans certaines conditions physiopathologiques (59). Aujourd'hui, nous savons qu'une élévation de l'ADMA plasmatique, ainsi qu'une diminution du ratio arginine/ADMA, a lieu en cas d'hypercholestérolémie et que cette élévation de l'ADMA est corrélée avec une dysfonction endothéliale (277). Des élévations de l'ADMA plasmatiques peuvent aussi jouer un rôle dans l'hyperhomocystéinémie, l'hypertension, le diabète, la résistance à l'insuline, l'insuffisance cardiaque chronique et dans les maladies artérielles périphériques occlusives (225, 277), résultant en une activité diminuée de la NOS. Ceci est cohérent avec les données de plusieurs études expérimentales qui suggèrent que des concentrations élevées d'ADMA (3-15 μ M) inhibent, de manière significative, la synthèse vasculaire de NO (213, 278). Les mécanismes susceptibles de

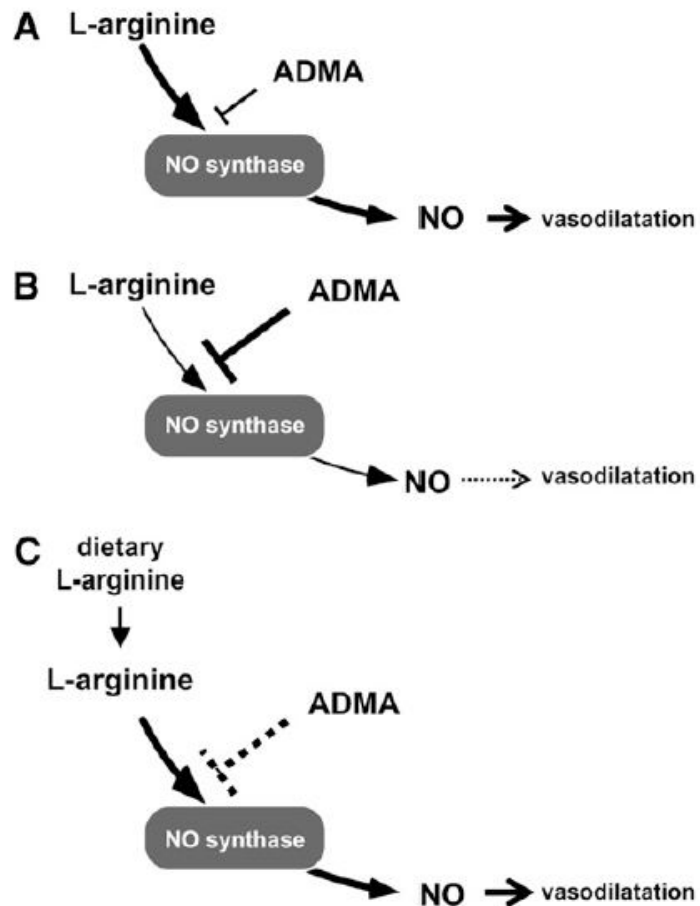


Figure 44 : Paradoxe de l'arginine et ADMA

A : En présence de faibles concentrations en ADMA, les concentrations physiologiques de l'arginine permettent une activité maximale de eNOS et la synthèse de NO.

B : Cependant, en présence de concentrations élevées d'ADMA, un inhibiteur endogène de la NO synthase, la conversion de l'arginine en NO est altérée, résultant en une diminution des actions biologiques du NO.

C : Dans de telles circonstances, même un léger changement des concentrations en arginine suite à une supplémentation en arginine peut restaurer la synthèse de NO à un niveau normal. *D'après (222).*

justifier les effets bénéfiques de l'arginine observés, notamment dans le cadre de l'hypercholestérolémie, suggèrent que la supplémentation pourrait compenser l'augmentation des concentrations d'ADMA, très fréquemment observée chez le patient présentant une dysfonction endothéliale ou des facteurs de risque cardiovasculaire (272, 279). En entrant en compétition avec la L-arginine au niveau du site catalytique de eNOS, l'accumulation d'ADMA limite la synthèse de NO. Ainsi, l'inhibition de l'activité de la NOS peut être surmontée par un excès de substrat et pourrait expliquer pourquoi l'arginine améliore la fonction endothéliale chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (213, 272). L'arginine serait donc bénéfique chez les patients avec des niveaux élevés d'ADMA mais n'aurait aucun effet sur les mécanismes NO-dépendants chez les sujets ayant des niveaux faibles ou normaux d'ADMA (279) (Figure 44). Cependant, ce mécanisme n'expliquerait pas la vasodilatation L-arginine-induite chez les Hommes sains chez lesquels les niveaux d'ADMA sont faibles. Notons que, comme les concentrations plasmatiques en ADMA sont très faibles (le rapport arginine/ADMA est de l'ordre de 200), l'importance réelle du phénomène d'inhibition compétitive souligne que le ratio doit être beaucoup plus faible au voisinage de eNOS, ce qui confirme à nouveau l'importante compartimentation métabolique (191).

4.3. Compétition des voies arginase et NO synthase

Etant donné que les arginases utilisent le même substrat qu'eNOS, elles ont été proposées comme des enzymes compétitives de eNOS. Au premier regard, il pourrait sembler que l'arginase ne puisse pas bien rivaliser avec la synthèse de NO pour l'arginine. Le K_m pour l'arginine est compris autour de 2-20 mM pour les arginases des mammifères (54, 182), ce qui est bien plus élevé que celui pour eNOS. Cependant, bien que l'affinité de eNOS pour l'arginine soit environ 1000 fois supérieure à celle de l'arginase, la V_{max} de l'arginase est environ 1000 fois supérieure à celle de eNOS (54), ce qui indique des taux similaires d'utilisation du substrat pour la synthèse de NO, à de faibles concentrations d'arginine. De ce fait, même si les concentrations plasmatiques en arginine ont été rapportées comme inchangées dans les maladies cardiovasculaires dans plusieurs études, il est possible que la biodisponibilité locale de l'arginine en tant que substrat pour la NOS puisse être toutefois réduite par l'activité arginase (205). Ainsi, l'arginase peut être un facteur limitant de la synthèse de NO. L'arginase est exprimée de façon constitutive dans les cellules endothéliales. Bien que certaines arginase I aient été détectées dans les cellules endothéliales humaines, l'isoforme prédominante est l'arginase II. Il existe des preuves solides que les niveaux

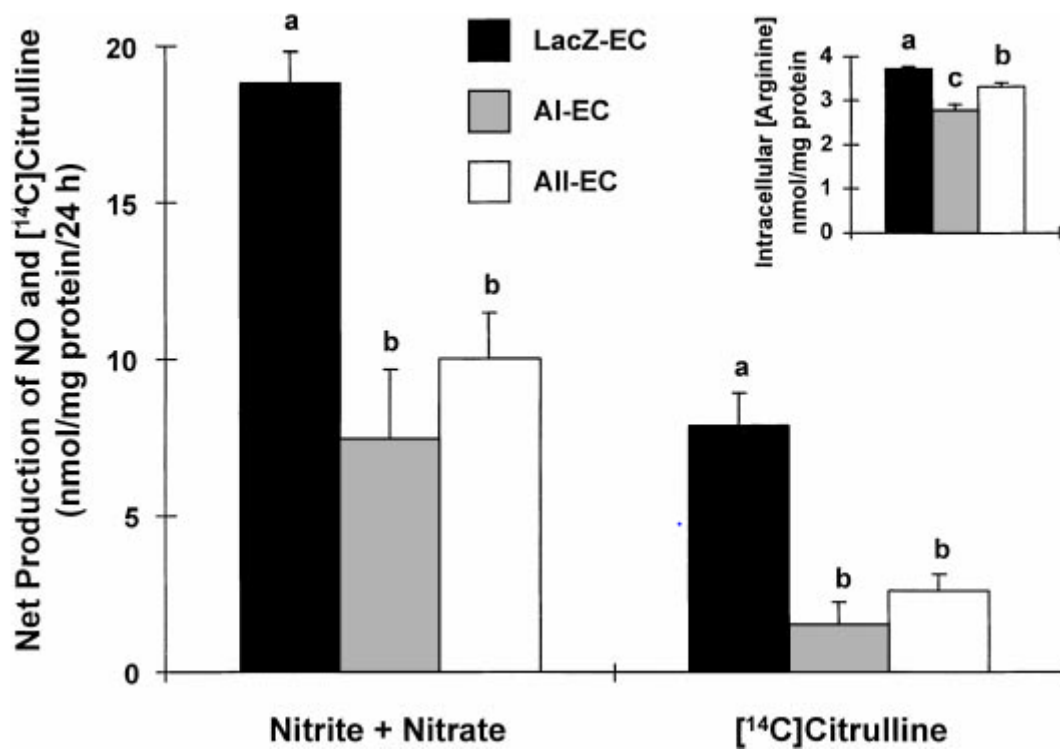


Figure 45 : Compétition des voies arginase et NO synthase pour la synthèse de NO

La synthèse de NO (indiquée par la production de nitrites + nitrates) est plus faible dans les cellules endothéliales transfectées avec l'arginase I (AI-EC) et l'arginase II (AII-EC), comparativement aux cellules endothéliales témoins transfectées avec LacZ (LacZ-EC). La synthèse nette de citrulline est aussi réduite dans les cellules endothéliales transfectées avec l'arginase I et II, comparativement aux cellules témoins. *D'après (281).*

constitutifs de l'activité arginase dans les cellules endothéliales, limitent la synthèse de NO et la fonction vasodilatatrice NO-dépendante (par ex. (181, 207, 208)). Cela a été confirmé expérimentalement dans un certain nombre d'études dans lesquelles l'inhibition de l'activité ou de l'expression de l'arginase a entraîné une augmentation de la synthèse de NO (209, 280). De plus, d'après les travaux de Li *et al.* (281), l'augmentation de l'expression des arginases provoque la diminution de la synthèse basale de NO, par une déplétion du stock d'arginine, d'où une diminution de la disponibilité pour la eNOS (Figure 45). Une large gamme d'agents peuvent induire l'expression de l'arginase lorsqu'ils sont administrés à des cellules endothéliales en culture, y compris des taux de glucose élevés (282), des LDL oxydés (283) et de l'H₂O₂ (284). Une augmentation de l'expression et de l'activité de l'arginase I a été impliquée dans de nombreuses maladies cardiovasculaires (182, 209, 282, 285). Parmi les conditions qui entraînent une expression endothéliale élevée de l'arginase *in vivo*, on trouve l'hypertension (209). Ainsi la dysfonction vasculaire due à une diminution de l'arginine induite par l'arginase peut être inversée avec une supplémentation en arginine (280), mais cela induit aussi une augmentation de l'activité arginase.

4.4. Découplage de la NO synthase

Des effets antioxydants ont été signalés pour la L-arginine, qui peuvent contribuer à accroître la biodisponibilité du NO. En effet, l'activité catalytique de la NOS peut être découplée sous certaines conditions physiopathologiques, résultant en un basculement de l'activité catalytique de la synthèse de NO vers la synthèse de superoxyde. Dans ce cas, l'arginine exogène permettrait de réduire la production d'anions superoxydes en augmentant la biodisponibilité de l'arginine pour eNOS (229, 286). Un scénario similaire se produit au cours de la période de reperfusion après une ischémie. La eNOS activée peut rapidement épuiser les stocks locaux d'arginine. Dans cet environnement appauvri en substrat, la eNOS peut subir un changement conformationnel, de façon à générer préférentiellement l'anion superoxyde (65, 229). Dans ce cadre, il est possible que l'augmentation des concentrations locales en arginine puisse favoriser la conformation dimérique de la NOS. Cependant, on ignore si la supplémentation en arginine est capable de surmonter une altération de la eNOS au point de restaurer l'activité du NO (229). De plus, simplement en agissant comme un antioxydant, l'arginine peut éliminer les anions superoxydes ou restaurer le cofacteur crucial BH₄ et ainsi éviter la synthèse de superoxyde par eNOS lorsqu'elle est dans un état "découplé" (182). Chez des patients atteints de maladie artérielle périphérique occlusive et

d'hyperhomocystéinémie, l'arginine améliore considérablement la FMD et réduit le stress oxydant (255).

4.5. Autres hypothèses

La glutamine ne modifie pas l'activité de eNOS, mais inhibe la synthèse de NO par les cellules endothéliales, et cette inhibition peut être antagonisée par l'arginine (287, 288). Cette propriété régulatrice de la glutamine peut contribuer au « paradoxe de l'arginine » dans les cellules endothéliales, et est susceptible d'être d'une importance physiologique. Cependant, le mécanisme responsable de l'inhibition de la synthèse endothéliale de NO par la glutamine et son antagonisme par l'arginine ne sont pas connus.

Giugliano *et al.* ont démontré que des perfusions en intraveineuses de L-arginine stimulent la libération d'insuline (223). Ils ont démontré en outre que cette augmentation de l'insuline plasmatique induit une vasodilatation périphérique, diminue l'agrégation plaquettaire, et diminue la viscosité du sang, que d'autres ont attribué à une meilleure synthèse de NO (223). La vasodilatation produite par la L-arginine est abolie par l'octréotide, qui inhibe la libération d'insuline. Cet effet de l'octréotide est inversé par l'addition d'insuline durant la perfusion d'arginine (pour mimer l'effet de stimulation de la libération d'insuline par la L-arginine). Certains des effets vasoactifs de l'insuline sont inhibés avec un antagoniste de la NOS (289) et seraient ainsi dépendants de la libération endogène de NO. Enfin, les données de Giugliano *et al.* (223) sont susceptibles de ne pas être applicables à des études dans lesquelles de l'arginine orale a été utilisée. Avec des doses orales d'arginine, les concentrations d'arginine plasmatiques sont approximativement doublées, tandis que dans les études de Giugliano *et al.* (223), les concentrations sont augmentées de façon spectaculaire. Ainsi, les effets de l'arginine orale sont peu susceptibles d'être provoqués par des changements au niveau de l'insuline plasmatique.

4.6. Conclusion

Ce paradoxe a été énoncé très tôt mais il se résout si on considère, comme on l'a vu plus haut, que eNOS se trouve en réalité au sein d'une organisation complexe et compartimentée. L'existence des cavéoles, l'activité de CAT-1, le rôle des cofacteurs, l'existence d'inhibiteurs et la présence d'arginase sont autant d'éléments pour expliquer ce paradoxe. Au final, le K_m apparent de la synthèse de NO à partir d'arginine extracellulaire est de 73-150 μM , c'est à dire dans la gamme des K_m des systèmes de transports de l'arginine (100-150 μM) et des concentrations plasmatiques (50-150 μM à jeun, 100-250 μM en

postprandial) (54). Dans ces conditions, l'accessibilité du substrat au niveau intime de l'enzyme est susceptible de moduler la synthèse de NO

En conclusion et d'une façon générale, l'effet et l'intérêt d'une augmentation de l'apport en arginine à doses nutritionnelles (~3-8 g/j) sur la synthèse de NO et la modulation de fonctions régulées par le NO restent à démontrer chez l'Homme sain. A l'inverse, une supplémentation d'arginine à doses supra-nutritionnelles (~9-24 g/j) a des effets bénéfiques avérés dans certaines situations pathologiques cardiovasculaires. Parmi les nombreux effets bénéfiques de l'arginine, la plupart sont dépendants du NO, qui est un acteur central de l'homéostasie de l'endothélium vasculaire, jouant un rôle crucial dans la fonction endothéliale, et le dysfonctionnement de la voie de signalisation dans laquelle il est impliqué conduit à une dysfonction endothéliale qui joue un rôle clé dans le développement de l'athérosclérose et du syndrome métabolique.

D. CONCLUSION ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX

1. Conclusion

Comme nous l'avons décrit dans la troisième partie de l'introduction bibliographique, peu d'études de supplémentation chez le sujet sain, à de faibles doses d'arginine (3 à 8 g/j), ont été réalisées. La littérature rapporte en majorité des données sur l'effet bénéfique de fortes doses d'arginine (le plus souvent entre 9 et 24 g/j) chez le sujet à risque ou malade. Comme rapporté par la méta-analyse de Bai *et al.*, l'effet de l'arginine ne s'exercerait que lorsque la fonction endothéliale est altérée (30). Dans ce cas, l'effet sur la fonction endothéliale semble pouvoir s'exercer dès les faibles doses d'arginine (30, 243, 245, 247), qui peuvent être atteintes par l'alimentation, ce qui suggère que l'apport nutritionnel quotidien peut influencer sur la santé vasculaire. Des études contrôlées, de supplémentation à faibles doses d'arginine, sont ainsi nécessaires, car il y a de plus en plus de preuves que la teneur en arginine des protéines alimentaires peut expliquer leurs effets bénéfiques sur la fonction endothéliale (176, 178). Cependant, dans le cas des protéines alimentaires, l'arginine est lentement mise à disposition, ce qui peut affecter son orientation métabolique et ainsi son utilisation pour la synthèse de NO.

L'hypothèse principale expliquant un effet favorable de la supplémentation en arginine, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction bibliographique, correspond à la capacité de l'arginine administrée à être convertie en NO pour renforcer la fonction endothéliale, autrement dit à un « effet substrat ». Cependant, comme la demi-vie du NO est exceptionnellement courte, cet effet est attendu comme labile (193). Aussi, un effet de la supplémentation n'est attendu que dans la mesure où, et au moment où, la supplémentation augmente effectivement la biodisponibilité de l'arginine. A l'inverse, si on considère donc qu'un effet de la supplémentation en arginine n'est susceptible de s'exercer que si et quand l'arginine est fournie à l'organisme – pratiquement quand l'argininémie est significativement augmentée – les effets de faibles doses, à l'échelle alimentaire (c.-à-d. quelques grammes), pourraient ne s'exercer que de façon transitoire, pendant la phase d'absorption et de mise à disposition de l'arginine. Un effet durable requerrait donc plutôt des doses très importantes (de l'ordre de 12 g/j), capables d'entraîner une élévation de la mise à disposition d'arginine sur la journée, comme en témoigne l'élévation à jeun de l'argininémie (par exemple, (98)). Une autre possibilité serait que l'arginine soit absorbée et mise à disposition de façon lente, comme c'est le cas de l'ensemble des acides aminés ingérés sous forme de protéines dans des

repas en situation alimentaire usuelle (290, 291), ou comme ce peut être le cas avec des formulations galéniques à libération prolongée (LP), pour une supplémentation en arginine seule (185). Signalons alors que la libération lente d'arginine par une forme LP apparaît (ou est susceptible de) mimer la libération « nutritionnelle » de l'arginine apportée par les protéines alimentaires. Néanmoins, la mise à disposition et la pharmacocinétique de l'arginine administrée par voie orale reste mal décrite. Les estimations d'extraction de premier passage de l'arginine varient entre 30 % et plus de 60 % (195, 196, 212, 292). Cependant, la biodisponibilité de l'arginine est globalement élevée, comme en témoigne l'élévation importante, dose-dépendante, de l'argininémie après ingestion (185, 264). Quand l'arginine est administrée sous forme libre, les temps de pics de concentration sont précoces (T_{max} d'environ 1 h), l'arginine disparaissant ensuite assez rapidement (185, 193, 194, 264). En outre, la mise à disposition rapide d'arginine est susceptible de favoriser son extraction de premier passage. De façon générale, il est connu que l'utilisation des acides aminés vers les voies cataboliques est d'autant plus importante que l'absorption est massive et brutale (291, 293); il pourrait s'agir là d'un mécanisme général de régulation homéostatique permettant de prévenir une trop forte augmentation des concentrations systémiques en acides aminés.

Enfin, on sait également peu de chose sur l'utilisation pour la synthèse de NO de l'arginine mise à disposition oralement. Différentes observations et théories ont été proposées pour comprendre comment l'organisme utilise l'arginine circulante (1, 16, 294-296). Le métabolisme de l'arginine apparaît notamment très compartimenté (54, 297, 298) et la voie d'utilisation de la synthèse systémique de NO pourrait également être en compétition avec la voie de l'hydrolyse par l'arginase (181, 208), ou encore sujette à l'action d'un inhibiteur compétitif de la synthèse, l'ADMA (222). Chez l'homme sain, sans facteurs de risque, l'utilisation de l'arginine orale pour la synthèse de NO paraît très modeste, avec une très faible contribution du compartiment circulant d'arginine à la synthèse de NO (196, 264). La synthèse de NO à partir de l'arginine ingérée reste néanmoins dépendante de la dose administrée, confirmant le principe que l'arginine est bien un donneur de NO (196, 222, 264). En revanche, en situation de dysfonction endothéliale associée à des facteurs de risque cardiovasculaire, quand la synthèse totale de NO est amoindrie, on s'attend à ce que la contribution de l'arginine alimentaire ou circulante soit plus importante. Ceci est prédit par un certain nombre de théories métaboliques et biochimiques (207, 222) et surtout par le fait, détaillé plus haut, que l'administration d'arginine améliore la fonction endothéliale quand celle-ci est altérée (30). Enfin, une cinétique lente pourrait avoir un impact sur son utilisation

métabolique. En effet, une cinétique lente pourrait limiter l'activation de la voie d'élimination métabolique et favoriser l'utilisation de l'arginine orale dans d'autres voies (185, 290, 291).

Nous avons vu en deuxième partie de l'introduction bibliographique, que chez des sujets sains, l'ingestion d'un repas riche en acides gras saturés et/ou en saccharose induisait un ensemble d'évènements délétères et transitoires, tels qu'une diminution de la réactivité vasculaire associée à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et une élévation des marqueurs pro-inflammatoires, indiquant l'apparition d'une dysfonction endothéliale au cours de la phase postprandiale (154, 165, 169, 299). Comme les trois quarts de notre journée se déroulent en phase postprandiale, il a été suggéré que le risque nutritionnel cardiovasculaire se constituait progressivement par la répétition de ces évènements postprandiaux indésirables (299). Ainsi, l'examen de la dysfonction endothéliale dans cette fenêtre d'étude postprandiale est tout à fait pertinent en ce qu'il permet d'analyser l'étape primordiale de la physiopathologie des désordres cardiovasculaires à son niveau d'apparition le plus précoce. Le fait que la supplémentation en arginine soit efficace lorsque la fonction endothéliale est altérée, suggère qu'elle pourrait également être efficace dans des conditions aiguës, impliquant une altération transitoire de la fonction endothéliale, par exemple pendant la période postprandiale, qui fait intervenir les mêmes mécanismes, à savoir une altération de la synthèse de NO (300-302). De plus, la dysfonction endothéliale postprandiale observée chez les sujets sains, est encore plus marquée chez les sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique (155, 156, 160, 161, 175). Cependant, peu d'études ont évalué les effets d'une supplémentation en arginine, au cours de la période postprandiale (179), notamment avec de faibles doses d'arginine (178, 263) et aucune n'a été menée chez des sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique.

Les relations entre les concentrations plasmatiques d'arginine, la synthèse de NO, et les maladies cardiovasculaires sont complexes. Une biodisponibilité réduite en arginine peut être due soit à un transport diminué de l'arginine ou à une augmentation des voies cataboliques, conduisant à une déplétion en arginine, et à des niveaux concomitants et élevés en ses produits du métabolisme, incluant l'ornithine et la citrulline. En effet, plusieurs études ont suggéré qu'une déficience relative en arginine est présente chez les sujets atteints d'hypertension ou d'insuffisance cardiaque en raison d'un transport de l'arginine altéré (56, 303-305). Par conséquent, les concentrations « fonctionnelles » en arginine pourraient être reflétées par l'argininémie basale mais aussi par l'état d'équilibre systémique entre la biodisponibilité en arginine et le niveau d'utilisation de l'arginine par l'arginase et la NO

synthase (303). Dans plusieurs états pathologiques, les niveaux d'arginase sont augmentés et ont été proposés comme facteur limitant pour la synthèse de NO. Cette limitation de la synthèse de NO est le résultat d'une compétition indirecte avec la NO synthase. L'arginase conduit à la formation d'ornithine et par la suite de citrulline, qui à son tour, peut être reconvertie en arginine (58). Par conséquent, il a été supposé que les concentrations « fonctionnelles » en arginine pouvaient être affectées par différents processus qui pourraient réduire la biodisponibilité en arginine pour la NO synthase. Un concept de «ratio de la biodisponibilité global en arginine" ("global arginine bioavailability ratio, GABR), qui correspond au ratio arginine/[ornithine+citrulline], a alors été proposé pour tenir compte des niveaux de substrat (arginine) et de ses principaux produits du métabolisme (ornithine et citrulline) *in vivo* (306). Le GABR fournirait, ainsi, un autre indice sur la capacité à synthétiser du NO, en plus de l'argininémie basale. En effet, un GABR diminué est associé, de façon significative, à la fois au développement de coronaropathies obstructives et à un risque accru, sur le long terme, de la survenue d'évènements cardiovasculaires indésirables majeurs (306). Ainsi, une dérégulation du métabolisme de l'arginine peut être identifiée à l'aide du GABR, ou d'autres ratios tels que les ratios arginine/ADMA ou arginine/ornithine. Plusieurs études ont mis en évidence une association entre une altération systémique de la biodisponibilité en arginine et les maladies cardiovasculaires (285, 303, 307-309). De ce fait, les concentrations basales en arginine pourraient donc refléter la configuration métabolique sous-jacente du métabolisme de l'arginine (c-à-d. l'équilibre entre la synthèse *de novo*, l'apport alimentaire et la dégradation de l'arginine) et ainsi la capacité de mobilisation de l'arginine pour soutenir la synthèse de NO dans une situation dynamique où celle-ci est compromise.

2. Hypothèses et objectifs des études

Ainsi à l'issu de cette revue des connaissances, il apparaît que l'arginine, à des doses relativement faibles, sous une forme lentement mise à disposition, pourrait améliorer la fonction endothéliale de sujets sains se trouvant physiopathologiquement dans une situation de syndrome métabolique, où une diminution de la synthèse de NO est observée (14-17, 310, 311). Le mécanisme sous-jacent serait l'utilisation de cette arginine pour la synthèse de NO (22, 54, 181, 208, 294-298, 312). Cependant, aucune donnée directe, *in vivo*, n'est disponible chez l'Homme, pour soutenir l'hypothèse que l'arginine orale/alimentaire, dans un contexte nutritionnel, est utilisée différemment pour la synthèse de NO, chez des sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Enfin, le mécanisme à l'origine des effets bénéfiques de

la supplémentation en arginine sur la dysfonction endothéliale, pourrait être particulièrement apparent lors d'une diminution transitoire de la synthèse de NO, comme lors de la période postprandiale. Ces bénéfices de la supplémentation en arginine pourraient également varier en fonction du statut basal d'argininémie, qui pourrait rendre compte de la biodisponibilité en arginine pour la synthèse de NO. L'objectif de ce travail de thèse a donc été de tester ces hypothèses par des études chez l'Homme, de supplémentations nutritionnelles en arginine, c'est-à-dire à faible dose et sous une forme à libération prolongée (LP). Plus précisément, nous avons formé les deux hypothèses suivantes :

Hypothèse n°1 : l'arginine-LP est davantage utilisée pour la synthèse de NO que l'arginine à libération immédiate (LI), et davantage chez les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique.

Hypothèse n°2 : la supplémentation en arginine à libération prolongée améliore la fonction endothéliale à jeun et en postprandial chez les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Cet effet pourrait varier en fonction du statut basal d'argininémie de ces sujets.

Nous avons ainsi réalisé deux études, qui avaient les objectifs suivants :

Etude n°1 : à l'aide d'arginine alimentaire marquée (arginine ¹⁵N), notre première étude visait à étudier la biodisponibilité et l'utilisation de l'arginine alimentaire pour la synthèse de NO, en fonction de sa cinétique de libération (c.-à-d. selon qu'elle était consommée sous une forme à libération immédiate (LI), ou sous une forme LP mimant la mise à disposition naturelle de l'arginine alimentaire), et de tester l'hypothèse que cette utilisation pour la synthèse de NO serait plus élevée chez des sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique, chez qui la synthèse de NO est amoindrie (dans notre cas, des sujets avec un « tour de taille hypertriglycéridémique » (109, 110, 113, 116, 313, 314)), comparativement à des sujets témoins en bonne santé.

Etude n°2 : notre deuxième étude visait à tester l'effet d'une supplémentation avec de faibles doses d'arginine-LP, sur la fonction endothéliale postprandiale, chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique (des sujets avec un tour de taille hypertriglycéridémique toujours), mais également de tester si cet effet pouvait différer entre les sujets selon leur argininémie basale, qui agirait comme un prédicteur de la fonction endothéliale postprandiale après la supplémentation en arginine.

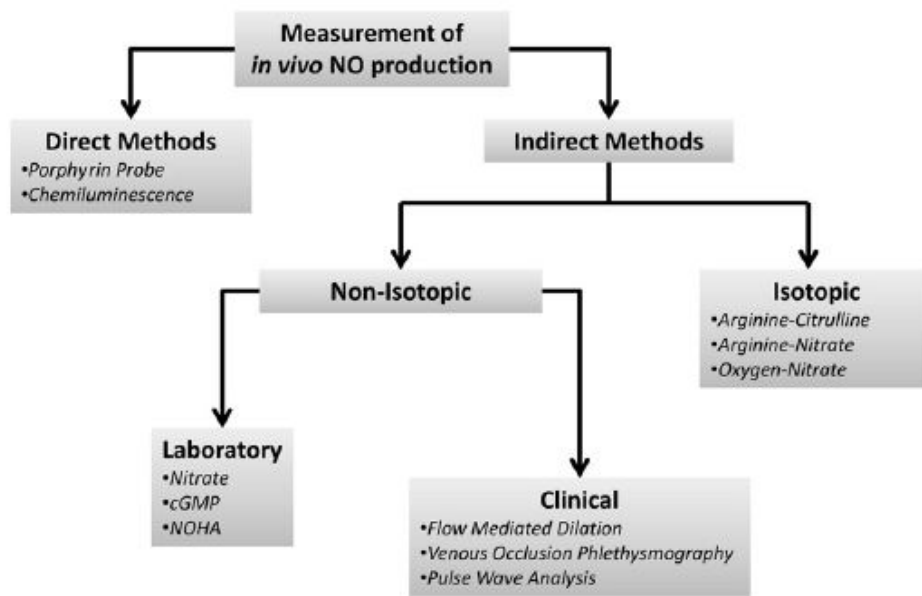


Figure 46 : Méthodes de mesure *in vivo* du NO

D'après (311).

E. METHODES D'EVALUATION DE LA SYNTHÈSE/BIODISPONIBILITE DU NO ET DE LA FONCTION ENDOTHELIALE CHEZ L'HOMME

1. Evaluation de la synthèse/biodisponibilité du NO

Chez l'Homme, de nombreuses méthodes, directes et indirectes, plus ou moins sensibles et spécifiques, ont été développées afin d'évaluer certains des métabolites du NO et ainsi la synthèse et/ou la biodisponibilité du NO (Figure 46) (315).

1.1. Indicateurs de la capacité de synthèse du NO

La demi-vie du NO dans le sang est très brève (<1s) en raison de sa rapide oxydation par l'oxyhémoglobine en nitrates et nitrites (regroupés sous le terme de NOx), de sa liaison à différentes structures cellulaires ou de son piégeage, et rend sa quantification directe souvent difficile voire impossible.

Ainsi, *in vivo*, la synthèse de NO est souvent évaluée en dosant la concentration plasmatique de ses métabolites (NOx) (316, 317). Les NOx peuvent être mesurés par un dosage spectrophotométrique dans le plasma ou au sein des cellules (par ex. les neutrophiles) ou encore dans la salive (16). L'analyse des NOx est relativement facile, mais peut être biaisée par l'apport de nitrates alimentaires, la clairance rénale ou la synthèse bactérienne intestinale (16). En 2001, l'étude de Lauer *et al.*, confirmée ensuite par de nombreuses études, a démontré que seuls les NO₂⁻ plasmatiques reflétaient véritablement des variations de la production du NO (318). En effet, alors que les NO₂⁻ retrouvés dans le plasma proviennent essentiellement du NO, les NO₃⁻ plasmatiques sont modulés par de nombreuses sources d'apport en nitrates, indépendantes de la synthèse de NO, au premier rang desquelles l'alimentation. En outre, de récentes études ont démontré, chez des sujets sains, qu'une contrainte de cisaillement entraînait une augmentation en NO₂⁻ plasmatiques (et non en NO₃⁻), qui était extrêmement bien corrélée avec l'augmentation du flux sanguin (319). Les NO₂⁻ plasmatiques sont donc considérés comme un marqueur de la synthèse mais aussi de la biodisponibilité du NO (320). Une attention toute particulière a été donnée à la précision et à la reproductibilité des méthodes de dosage des NO₂⁻ plasmatiques, en utilisant des techniques telles que la GC-MS, la chimioluminescence ou l'analyse par injection en flux continu (321, 322).

Une méthode plus directe pour mesurer la synthèse de NO est de mesurer la conversion d'arginine marquée à l'aide d'un isotope stable de l'azote (par ex. L-[¹⁵N₂-²H₂] or L-[¹⁵N₂]-guanidino-arginine), administrée par voie intraveineuse ou orale, en ses métabolites (¹⁵NOx

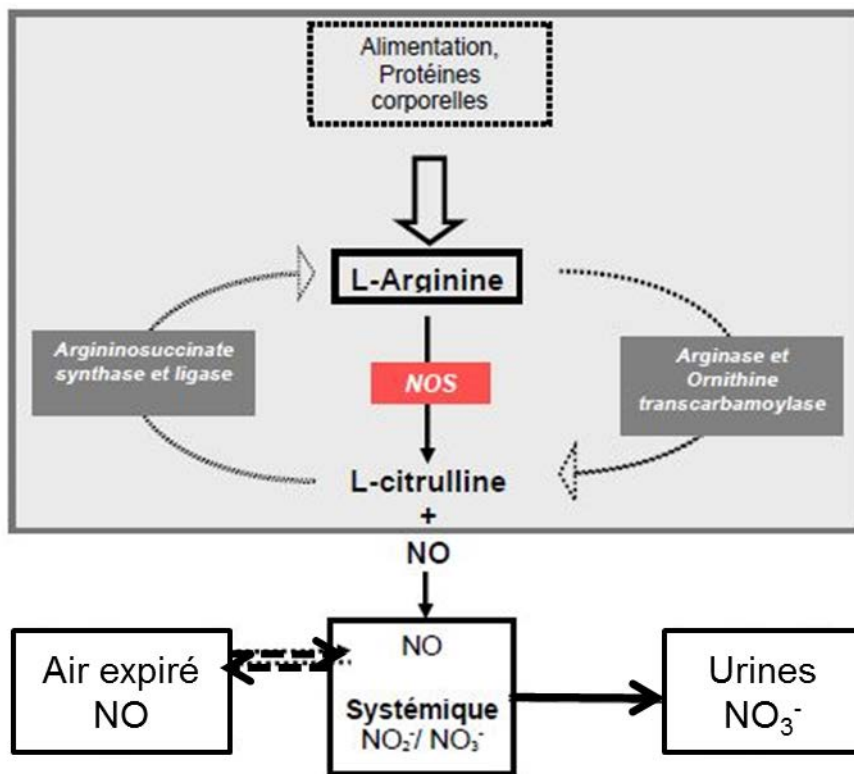


Figure 47 : Voie de synthèse et de dégradation du NO

L'arginine, substrat de la synthèse de NO, est principalement issu de la protéolyse. Une fraction de l'arginine est synthétisée de façon endogène à partir du cycle de l'urée et de la conversion de la citrulline. Après une conversion en nitrites/nitrates au niveau systémique, le NO produit, peut être expiré ou excrété sous forme de nitrates urinaires. *D'après (324).*

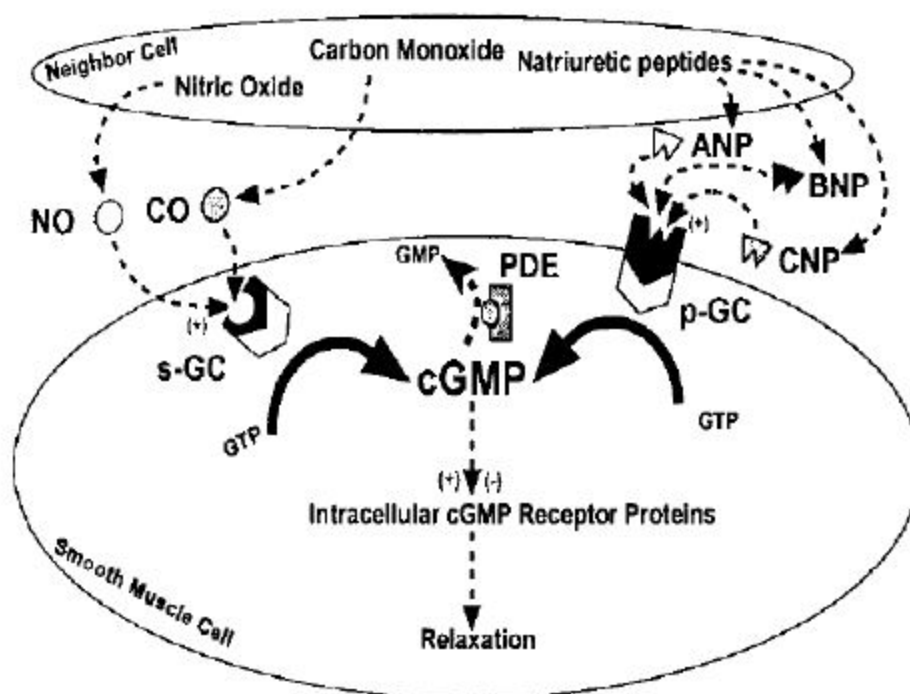


Figure 48 : Deux types de guanylate cyclase au niveau des cellules musculaires lisses

Au niveau des cellules musculaires lisses, le GMPc est synthétisé à partir du GTP par l'activation de deux guanylates cyclase, la guanylate cyclase soluble (s-GC) et la guanylate cyclase membranaire (p-GC). Alors que la s-GC, cytosolique, est activée par le NO et le monoxyde de carbone, la p-GC est activée par des peptides natriurétiques (ANP : atrial natriuretic peptide, BNP : Brain natriuretic peptide, CNP : C-Type natriuretic peptide). *D'après (328).*

ou [^{15}N]-citrulline) (189, 323, 324). En effet, comme la synthèse du NO ne correspond qu'à environ 0,26-1% du flux plasmatique d'arginine chez l'Homme sain, marquer la L-arginine au niveau de l'azote de son groupement guanidium, spécifiquement utilisé par la NOS, permet de discriminer la voie de synthèse du NO (Figure 47). Ainsi, après l'administration orale/intraveineuse d'une dose de [^{15}N]-arginine, les enrichissements isotopiques des différents métabolites du NO, au niveau plasmatique ou urinaire, peuvent être mesurés de façon très précise par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (16, 72, 264, 300). La mesure de l'enrichissement isotopique en [^{15}N]-citrulline (L-[ureido- ^{15}N - $^2\text{H}_2$] or L-[ureido- ^{15}N]-citrulline) ou en $^{15}\text{NO}_2^-$ plasmatiques, ou encore en $^{15}\text{NO}_3^-$ urinaires, permet une évaluation de la synthèse corps entier du NO à partir de l'arginine tracée (317, 324). Il est à noter que la mesure de la synthèse de NO par la technique des traceurs peut ne pas tenir compte d'une éventuelle compartimentation du métabolisme du NO (inter-organes et intracellulaire) et ainsi sous-estimer la synthèse de NO (324).

Actuellement, le développement de technique de piégeage du NO par des complexes ferriques, formant alors des adduits paramagnétiques stables du NO, qui pourront ensuite être mesurés par résonnance paramagnétique électronique, représente une voie prometteuse d'évaluation de la synthèse du NO (325).

1.2. Indicateurs de la biodisponibilité du NO

La sensibilité de la technique de chimioluminescence permet actuellement de doser les RSNO dans le plasma (326). Une étude récente a montré qu'une diminution des RSNO plasmatiques était observée chez des sujets à risque cardiovasculaire et était associée à une diminution de la vasodilatation hyperémique, suggérant ainsi que les RSNO pouvaient représenter un marqueur de la biodisponibilité du NO (327).

Une autre possibilité d'évaluer indirectement la biodisponibilité du NO est la mesure des concentrations plasmatiques de GMPc. En effet, le principal effecteur intracellulaire du NO étant la guanylate cyclase soluble, qui répond par la production de GMPc en grande quantité, le GMPc plasmatique peut être considéré comme un marqueur de la biodisponibilité du NO (328). Cependant, deux types de guanylates cyclases ont été identifiés au niveau des cellules musculaires lisses, la guanylate cyclase soluble, NO dépendante et la guanylate cyclase membranaire, non stimulée par le NO mais par des peptides natriurétiques (Figure 48). Il a été montré que la production de GMPc était principalement stimulée par le NO et le peptide natriurétique atrial (ANP) (328, 329). Ainsi, les variations de GMPc au niveau plasmatique

Tableau 8 : Facteurs circulants utilisés comme marqueurs de la fonction endothéliale

Vasodilatateurs	Nitrates et nitrites (métabolites du NO), 6-kéto-PGF1 α (métabolite de la prostacycline)
Vasoconstricteurs	Endothéline-1, angiotensine II, thromboxane A ₂ , radicaux libres de l'oxygène, prostaglandine H ₂
Marqueurs de l'inflammation	Protéine C-réactive, molécules d'adhésion cellulaire (sélectine P et E, ICAM-1, VCAM-1), MCP-1, interleukines (IL-6, IL-8), TNF α
Marqueurs de l'hémostase	Activateur tissulaire du plasminogène (tPA), inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), facteur Von Willebrand (vWF), thrombomoduline
Autres	Dérivés asymétriques de la L-arginine (ADMA), microparticules apoptiques, facteurs de croissance (VEGF)

D'après (403).

peuvent être utilisées comme marqueur de la bioactivité du NO en vérifiant que les concentrations en ANP plasmatiques restent inchangées (330).

Au regard de la complexité des voies de régulation du NO mais aussi des techniques de dosage des dérivés du NO, il apparaît que ce n'est que par la combinaison de plusieurs marqueurs de synthèse et de biodisponibilité du NO, qu'une évaluation pertinente des variations de synthèse et de biodisponibilité du NO est possible.

2. Méthodes d'exploration de la fonction/dysfonction endothéliale chez l'Homme : généralités

Actuellement, l'exploration clinique de la fonction endothéliale est réalisée au moyen de méthodes fonctionnelles, qui étudient de façon directe l'endothélium d'un segment vasculaire donné, et de méthodes biochimiques, qui évaluent l'endothélium vasculaire au moyen d'indicateurs circulants (pro-inflammatoires, pro-thrombotiques et vasoconstricteurs), témoignant de son activité ou de son intégrité de façon plus globale. Nous focaliserons notre exposé sur les méthodes d'évaluation les plus largement utilisées en exploration clinique.

2.1. Méthodes d'exploration indirectes : analyse des marqueurs biologiques

Les méthodes biologiques d'évaluation de la fonction endothéliale ne sont pas spécifiques mais présentent l'avantage de leur simplicité sur le plan clinique puisqu'il s'agit généralement de dosages de facteurs circulants d'origine endothéliale, réalisés à partir de prélèvements sanguins ou urinaires par des méthodes immunologiques courantes. L'utilisation de marqueurs de synthèse et de biodisponibilité du NO ne rend compte que de façon parcellaire de la dysfonction endothéliale. Plusieurs autres marqueurs associés à la réponse inflammatoire ou thrombotique ainsi que des vasoconstricteurs sont utilisés comme des indicateurs de dysfonction endothéliale (Tableau 8). En effet, des concentrations plus élevées en un grand nombre de marqueurs circulants tels que des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, sélectine-E et P) et des médiateurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques (interleukine(IL)-6, PAI-1, IL-1 β , IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , facteur de von willebrand) ont été observées chez des sujets atteints de maladies athérothrombotiques et chez des sujets à risque cardiovasculaire, par rapport à des sujets sains (92).

2.1.1. Marqueurs solubles d'activation endothéliale et d'inflammation

Ces molécules sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et témoignent de l'activation endothéliale en participant aux processus de recrutement, d'adhésion et de

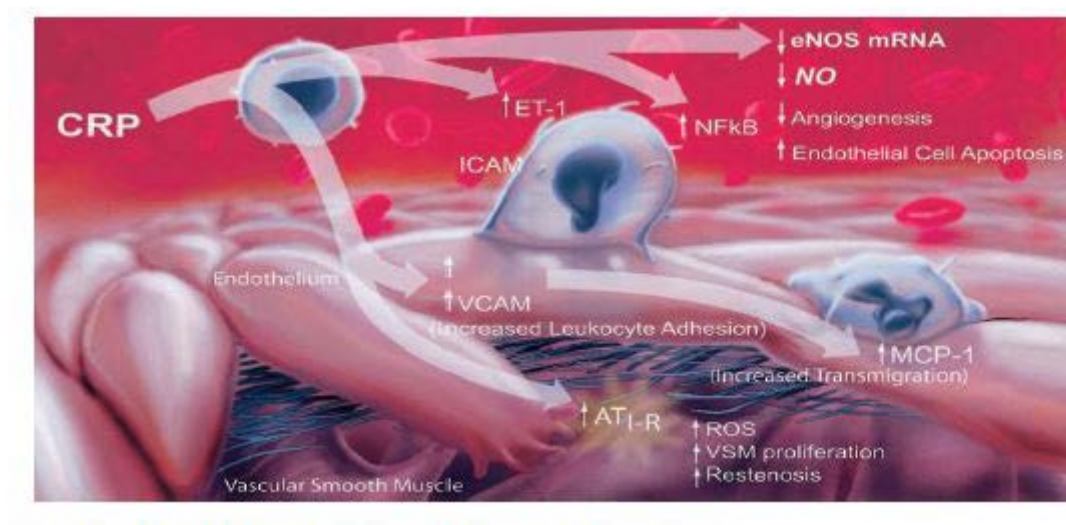


Figure 49 : Impact de la CRP sur l'activation endothéliale

Différentes études ont démontré qu'une augmentation des concentrations plasmatiques en CRP induisait une altération de la synthèse du NO et activait les voies de signalisation de l'angiogenèse, l'adhésion et la migration leucocytaires, la prolifération cellulaire et l'apoptose. *D'après (83).*

migration des leucocytes. Des taux circulants élevés, corrélés à une diminution de la réactivité endothéliale, ont été rapportés dans l'athérosclérose. De plus, ces taux sont associés à la présence de facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'intolérance au glucose, l'hypertension artérielle et l'hypercholestérolémie, et sont prédictifs de la survenue d'événements cardiovasculaires chez l'homme sain (331, 332). Lors de l'activation endothéliale, les cellules endothéliales, les leucocytes et les monocytes recrutés libèrent du TNF α , de l'IL-6 et d'autres cytokines entraînant le recrutement de cellules circulantes supplémentaires (332). La protéine C-réactive (CRP) libérée par le foie, en réponse à l'IL-6, favorise la synthèse endothéliale des molécules d'adhésion et le recrutement des monocytes à la surface de l'endothélium. De plus, cette protéine de phase aiguë semble participer à la dysfonction endothéliale, en modulant également par exemple la sécrétion et la synthèse endothéliale d'ET-1 ainsi que d'eNOS (Figure 49). De nombreuses études prospectives ont démontré que les concentrations plasmatiques en CRP constituaient un facteur prédictif de la survenue de pathologies cardiovasculaires (83, 333, 334). De plus, la fonction endothéliale est inversement corrélée à la CRP présente dans le sérum (335). Cependant, son taux peut être influencé par de multiples phénomènes inflammatoires extravasculaires qui rendent son interprétation parfois difficile au niveau individuel.

2.1.2. Marqueurs solubles de l'hémostase

tPA et PAI-1 sont libérés par les cellules endothéliales et régulent l'activité fibrinolytique. Des taux élevés de ces protéines sont observés dans l'athérosclérose. De plus, des études prospectives ont montré l'intérêt prédictif des taux de tPA dans la survenue des accidents cardiovasculaires chez le sujet sain et chez le coronarien (332, 336).

2.1.3. Vasoconstricteurs

Le NO et l'ET-1 régulent réciproquement leur synthèse, ainsi une diminution de la biodisponibilité en NO peut conduire à une augmentation de la synthèse d'ET-1, induisant ainsi une vasoconstriction et la libération de cytokines pro-inflammatoires (332, 337). Notamment, des taux circulants élevés d'ET-1 ont été observés parallèlement à une diminution de la réactivité endothéliale coronaire (337). De plus l'expression d'ET-1 est corrélée à l'évolution des plaques d'athérosclérose dans les artères humaines (338).

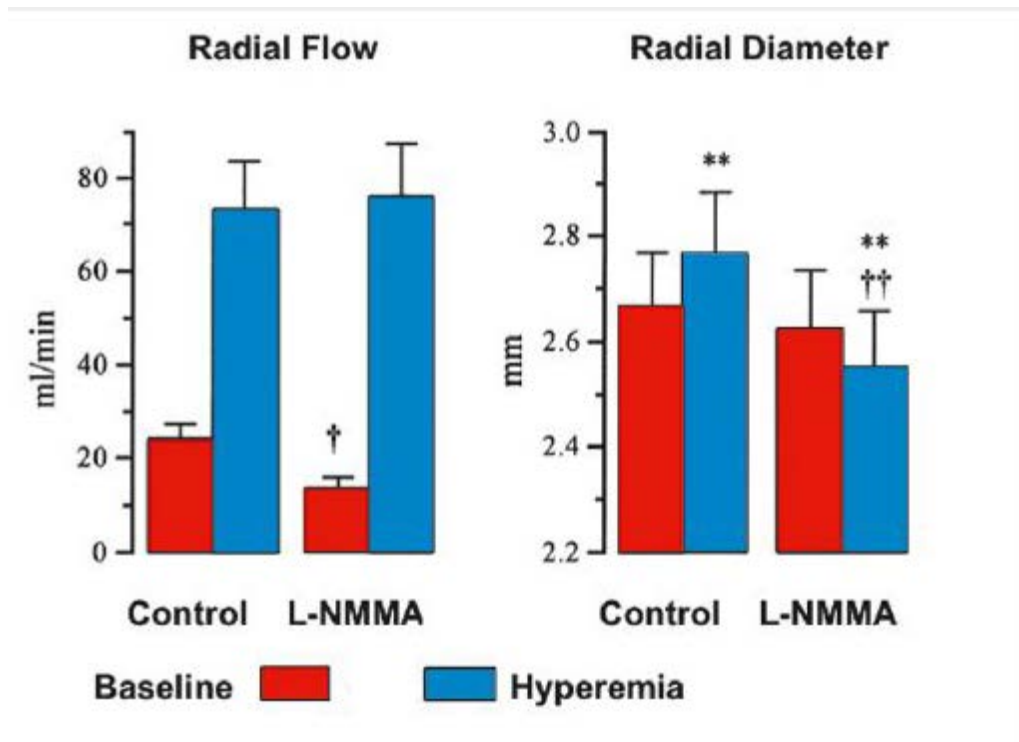


Figure 50 : Rôle du NO dans la FMD

Le flux de l'artère radiale (mL/min) et le diamètre de l'artère radiale (mm) sont mesurés en basal et au cours de l'hyperémie réactive, avant et après l'injection de N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA). En conditions basales, l'hyperhémie induit une augmentation du flux, suivi d'une augmentation du diamètre de l'artère radiale (FMD). Le L-NMMA diminue le flux sanguin à l'état basal sans affecter le diamètre de l'artère radiale et la réponse à l'hyperhémie. Cependant, le L-NMMA réduit la durée de la réponse hyperémique et conduit à une vasoconstriction. ** $P < 0,01$ par rapport au basal; † $P < 0,05$ et †† $P < 0,01$ par rapport à la valeur contrôle. D'après (345).

2.1.4. Autres marqueurs

L'ADMA, en tant qu'inhibiteur endogène compétitif d'eNOS, pourrait être considéré comme un marqueur indirect de l'altération de la synthèse du NO. De nombreuses études ont montré qu'une augmentation de l'ADMA plasmatique était observée non seulement chez des sujets atteints de maladies cardiovasculaires mais aussi chez des sujets à risque (hyperhomocystéinémie), par comparaison aux concentrations des sujets sains (59, 277, 312, 339). Enfin, récemment il a été montré que les microparticules, vésicules libérées lors de l'activation cellulaire et de l'apoptose, pouvaient être considérées comme des marqueurs de la fonction endothéliale. En effet, des taux élevés de microparticules induisent une dysfonction endothéliale en diminuant la synthèse/biodisponibilité du NO et en promouvant l'inflammation vasculaire qui favorisent l'état prothrombotique dans l'athérosclérose (340).

Cependant, bien que liés étroitement à la dysfonction endothéliale, la plupart de ces marqueurs ne sont pas spécifiquement synthétisés par l'endothélium. La CRP est synthétisée par le foie, et un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , MCP-1) et facteurs pro-thrombotiques (PAI-1) sont synthétisés et sécrétés non seulement par les leucocytes mais aussi par le tissu adipeux. Il est important de souligner que ces marqueurs circulants ne sont pas strictement des marqueurs de la dysfonction endothéliale mais reflètent plutôt des variations de l'état inflammatoire associé à la dysfonction endothéliale.

2.2. Méthodes d'exploration directes

2.2.1. Mesure de la vasodilatation dépendante du flux sanguin par la technique d'écho-doppler

La vasodilatation se divise en deux composantes distinctes que sont la vasodilatation indépendante et dépendante de l'endothélium. La première réfère à la capacité maximale de l'artère à se dilater en réponse à l'administration d'un donneur de NO, un puissant vasodilatateur, tel que la nitroglycérine. En contrepartie, la vasodilatation dépendante de l'endothélium réfère à la capacité des vaisseaux à se dilater suite à la synthèse endogène de NO par les cellules endothéliales.

Non invasive, la technique de mesure de la vasodilatation dépendante du flux ou FMD (pour flow-mediated dilation) repose sur la capacité des cellules endothéliales vasculaires à produire et relâcher du NO en réponse à une augmentation de la contrainte de cisaillement exercée sur les parois artérielles suite à une augmentation du flux sanguin (50) (Figure 50). Ainsi, l'évaluation de la FMD consiste en la mesure de variations du diamètre de l'artère

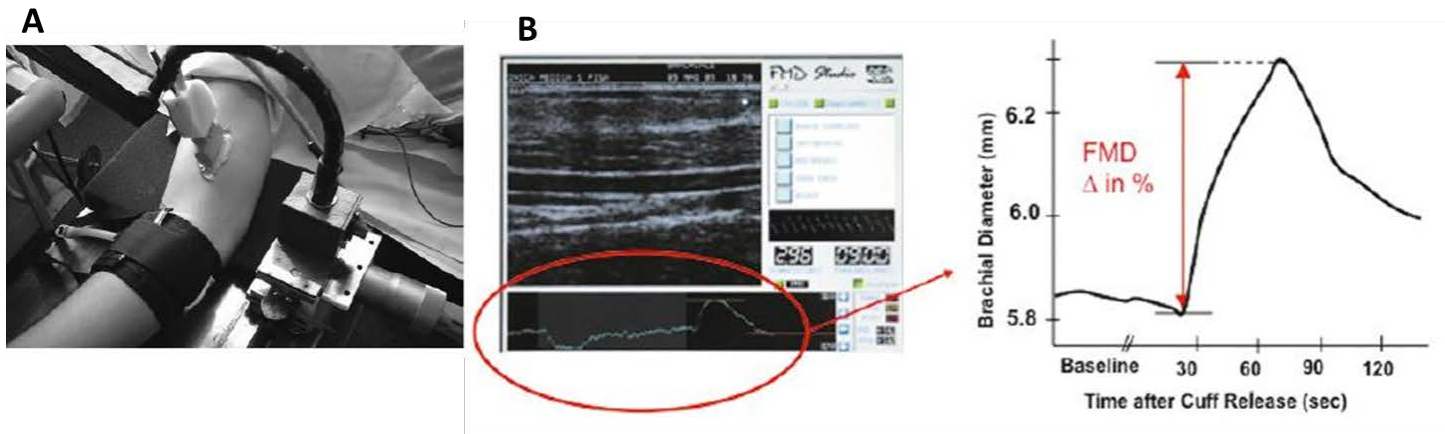


Figure 51 : Technique de mesure de la FMD

Sonde utilisée pour la mesure de la FMD (A) et signal de FMD obtenu avec un logiciel de détection des bords (B). Le ballonnet d'occlusion d'un sphygmomanomètre placé au niveau distale de l'artère brachiale est rapidement gonflé à 200mmHg puis progressivement dégonflé. La mesure en continu du diamètre de l'artère brachiale est réalisée à l'aide d'une sonde ultrason, avant, pendant et après le gonflement et le dégonflement du ballonnet d'occlusion. La FMD ou vasodilatation dépendante du flux sanguin est souvent exprimée en % de variation maximale du diamètre de l'artère brachiale. *Modifié d'après (345).*

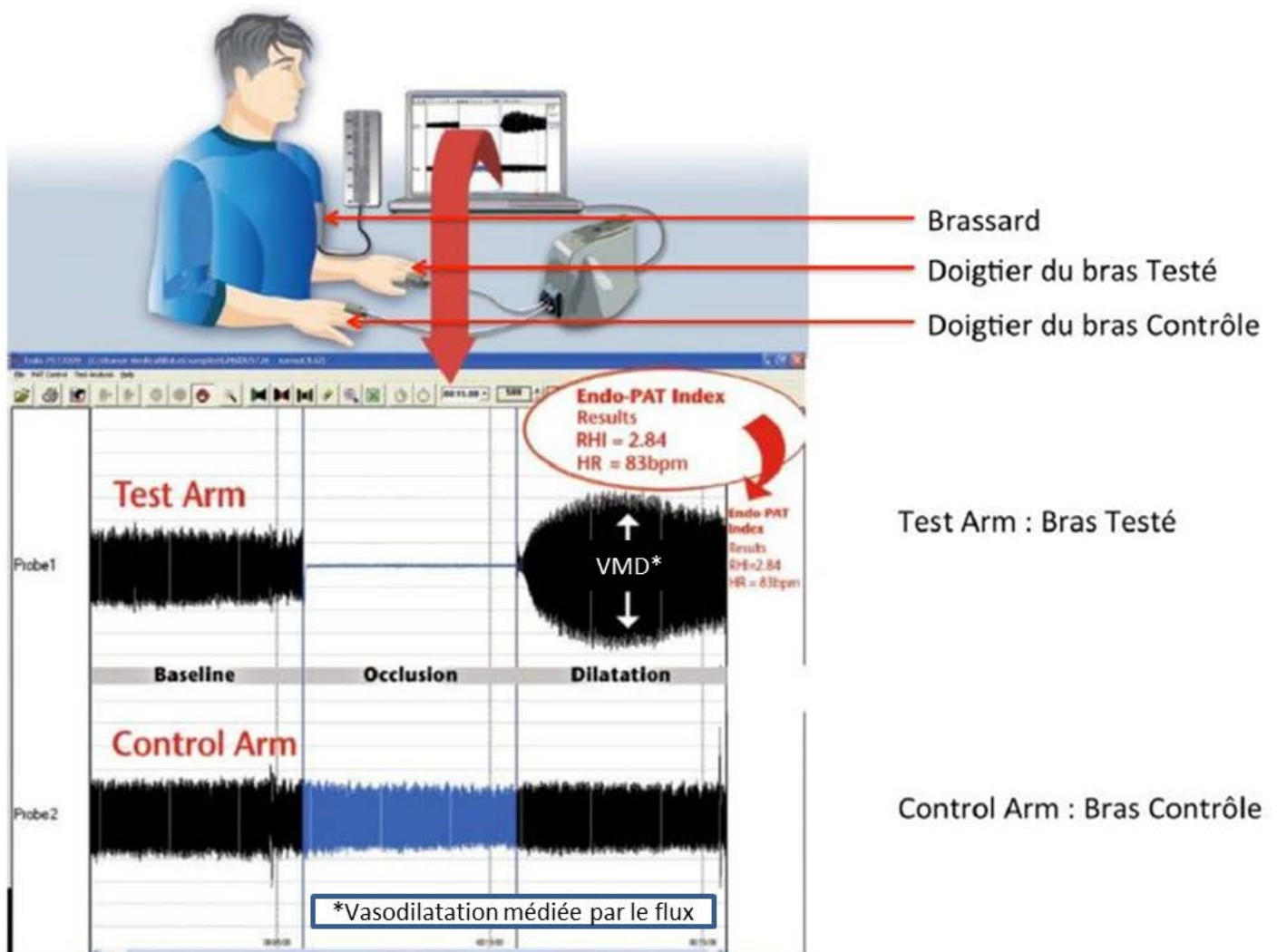


Figure 52 : Principe de la mesure du RHI par la technique EndoPAT

D'après (343).

brachiale ou radiale suite à une hyperémie (341). L'hyperémie réactive est une phase de vasodilatation qui apparaît après une occlusion (ischémie), généralement de 5 minutes de l'artère brachiale par un brassard gonflé à une pression supra-systolique. La variation post-ischémique du diamètre artériel est mesurée à l'aide d'un appareil d'échographie-doppler à haute résolution et d'un logiciel de détection des bordures permettant de mesurer le diamètre des vaisseaux étudiés (Figure 51). Ainsi, La FMD est exprimée en pourcentage de changement maximal du diamètre de l'artère par rapport à son niveau de base. Il a été démontré que la FMD était majoritairement NO-dépendante (332, 342). Bien que le principe de cette technique semble simple, son application est techniquement difficile et nécessite une formation approfondie et une standardisation. En effet, l'un des problèmes majeurs de la FMD est qu'il existe de nombreuses techniques de réalisation (343). Le positionnement des brassards peut changer (avant-bras, poignet), la durée d'ischémie est variable, allant de 3 à 5 minutes jusqu'à 15 minutes (343). De plus, la position de la sonde échographique lors de la réalisation de l'examen, et la mesure du diamètre des vaisseaux, en font une méthode longue à réaliser et très opérateur-dépendante (343-346). Cependant, parce qu'elle est non-invasive et qu'elle est la plus validée, cette méthode d'exploration de la fonction endothéliale est la plus largement utilisée et elle s'est imposée comme la référence en la matière.

2.2.2. Mesure de l'amplitude du volume digitale par pléthysmographie

Plus récemment, une technique de mesure de l'amplitude de l'onde de pouls au niveau digital a vu le jour. S'appuyant sur les principes de la FMD, la pléthysmographie digitale quantifie la réponse périphérique vasculaire à une hyperémie, par l'intermédiaire d'un appareil appelé EndoPAT, mesurant l'onde de pouls et la variation de volume digital. Non-invasif, l'appareil de mesure est composé de deux sondes digitales possédant un système de gonflage. Une sonde est placée sur l'index d'une main (bras étudié) et l'autre sert de contrôle sur la main controlatérale (bras de contrôle). Une pression de 70 mmHg est appliquée par la sonde sur chaque doigt, empêchant la distension veineuse distale et ainsi, inhibant l'accumulation veineuse et les réponses réflexes veino-artériolaires (345). Du côté du doigt testé, après mesure du flux basal, un brassard positionné au niveau du bras est gonflé au-dessus de la pression systolique durant 5 minutes, puis relâché, créant une vasodilatation réflexe, suite à l'hyperémie, mesurée par l'EndoPAT. L'amplitude de l'onde de pouls est enregistrée dans les deux doigts et un algorithme calcule automatiquement le ratio entre la moyenne d'amplitude sur une période de 1 minute, commençant 1,5 minutes après l'occlusion, et la moyenne au niveau basal (Figure 52). Cette valeur est l'indice d'hyperémie

réactive (RHI ou reactive hyperemia index), qui est modulé en partie par le NO (347); et plus cette valeur est élevée, plus elle indique une bonne fonction endothéliale, tandis qu'une valeur faible de RHI suggère une dysfonction endothéliale. L'EndoPAT, en analysant la géométrie de l'onde de pouls, permet également d'évaluer un paramètre de la rigidité artérielle, l'indice d'augmentation de la pression artérielle ou AI (augmentation index) (348). L'avantage majeur de la tonométrie artérielle périphérique (PAT) digitale réside dans sa reproductibilité et la facilité de la mesure automatisée (349).

2.2.3. Analyse de la géométrie de l'onde de pouls

L'onde de pouls est l'onde de déformation de la paroi artérielle suite à l'ébranlement sanguin dans l'aorte ascendante lors du choc d'éjection ventriculaire cardiaque. L'onde de pouls se propage sur la surface du sang le long des artères et provoque une déformation mesurable de la paroi artérielle. L'onde de pouls a deux composantes : une onde incidente et une onde réfléchie qui dépend du niveau des résistances périphériques, de la distance par rapport au site de réflexion et de la compliance artérielle. La morphologie de l'onde de pouls et sa propagation peuvent être recueillies par des méthodes non invasives.

Ainsi, un peu en marge des précédentes techniques, toujours dans l'optique d'évaluer le tonus vasculaire au niveau périphérique, des démarches plus indirectes et plus mécaniques, ont été associées à une exploration non-invasive de la fonction endothéliale. Ainsi, des variations de la rigidité artérielle, contrôlées en partie par l'endothélium (350), peuvent être évaluées par la mesure de vitesse de propagation de l'onde de pouls (351), au niveau des artères périphériques, à l'aide d'un tonomètre appliqué au niveau des artères radiales ou carotides. L'évaluation du volume du pouls digital par photopléthysmographie est une méthode alternative de mesure de la rigidité artérielle (352). L'évaluation des ondes directes et réfléchies au niveau digital, après ajustement sur la taille de l'individu, permet le calcul de deux indices : l'indice de rigidité artérielle (stiffness index, SI) qui est fortement corrélé à la vitesse de propagation de l'onde de pouls, et l'indice de réflexion (reflection index, RI) qui rend compte du tonus vasculaire (353).

Cependant, des corrélations entre ces méthodes d'évaluation de la rigidité artérielle et la méthode de référence d'exploration de la fonction endothéliale n'ont pas encore été démontrées et les mécanismes impliqués dans la régulation de la rigidité artérielle par l'endothélium restent largement méconnus. Il est important de souligner que l'EDHF semble être la voie de signalisation prépondérante impliquée dans la régulation du tonus vasculaire au

niveau de la microcirculation, contrairement aux vaisseaux de conductance où le NO est le vasodilatateur principal (350).

2.3. Evaluation de la dysfonction endothéliale en termes de risque cardiovasculaire

De nombreuses études cliniques ont été réalisées dans le but de savoir si ces méthodes d'exploration *in vivo* de la fonction endothéliale étaient capables de détecter une probable dysfonction endothéliale chez des sujets ayant des manifestations cliniques des pathologies cardiovasculaires (81). Par ailleurs, on a remarqué que ces méthodes d'exploration fonctionnelle de l'endothélium détectaient des altérations de la fonction endothéliale chez des sujets asymptomatiques à risque cardiovasculaire (7, 84). Ainsi, tous les principaux facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension artérielle, le diabète, l'hyperlipidémie, le tabagisme, l'hyperhomocystéinémie sont associés à une diminution de la FMD (84). La fonction endothéliale évaluée par la FMD constitue un marqueur de santé vasculaire qui permet de caractériser l'initiation et la progression du processus athérogène. L'étude de Framingham a trouvé une association négative et significative entre les scores de l'EndoPAT et de multiples facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (354). Par ailleurs, Kuvin *et al.* (355) ont étudié la relation entre le RHI et la présence ou l'absence de facteurs de risque cardiovasculaire, et ont déterminé qu'une valeur élevée du RHI était associée à un profil de risque cardiovasculaire plus favorable. Il a été également montré qu'une augmentation de l'AI était observée chez des sujets à risque cardiovasculaire (356). En revanche, il existe une faible corrélation entre la vitesse de propagation de l'onde de pouls et les facteurs de risque cardiovasculaire établis, en dehors de l'âge et de l'hypertension artérielle (357).

Ces mesures de la fonction endothéliale permettent non seulement de détecter et de discriminer des situations pré-pathologiques mais aussi d'apprécier l'effet de thérapeutiques sur la fonction endothéliale. Cependant, avant toute utilisation diagnostique, des améliorations concernant la standardisation et la reproductibilité des méthodes d'exploration, *in vivo*, de la fonction endothéliale restent à réaliser (346).

A. Choix de la population et du type de supplémentation utilisés pour la réalisation des travaux de thèse

1. Critères de sélection de la population étudiée

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction bibliographique, les supplémentations en arginine semblent être plutôt bénéfiques chez des sujets à risque ou malades, et ne semblent pas avoir d'effet sur les fonctions NO-dépendantes chez les sujets sains. Cependant peu d'études de supplémentation ont été réalisées chez des sujets sains. Nous avons donc choisi, au vu des données rapportées par la littérature, de tester l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en arginine chez des sujets sains, mais présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Dans la pratique, nous avons choisi d'étudier des sujets en surpoids non obèses (indice de masse corporelle compris entre 25 et 30 kg/m²) et présentant de façon conjointe, un excès de masse adipeuse abdominale (c.-à-d. avec un tour de taille supérieur à 94 cm pour les hommes et 88cm pour les femmes) et une triglycéridémie à jeun supérieure à 1,5 g/L. Ces critères n'ont pas été choisis au hasard. Nous avons vu que la définition « clinique » du syndrome métabolique chez le sujet sain implique la présence de 3 facteurs de risque sur les 5 considérés (excès de tour de taille, élévation de la triglycéridémie, faible HDL-cholestérolémie, élévation de la pression artérielle, élévation de la glycémie, ou présence alternativement de traitement médicamenteux pour réduire ces facteurs de risque (109, 110)). Parmi ces différents facteurs, l'excès d'adiposité viscérale, est réputé comme particulièrement contributif au syndrome métabolique (109). En outre, l'excès d'adiposité viscérale peut être facilement caractérisé par la mesure du tour de taille et sa stabilité dans le temps lui confère une bonne robustesse (113). L'élévation de la triglycéridémie vient bien compléter le critère d'adiposité viscérale, en permettant d'exclure les sujets en surpoids qui présenteraient un phénotype métabolique normal, et en identifiant à l'inverse, une composante importante explicative du regroupement de facteurs de risque cliniques du syndrome métabolique. De plus l'élévation de la triglycéridémie contribue de façon plus importante, et de manière plus homogène, aux processus physiopathologiques sous-tendus comme la diminution de la sensibilité à l'insuline et l'altération de la fonction endothéliale (116, 358, 359). La présentation conjointe d'un tour de taille important et d'une triglycéridémie augmentée est appelée le « tour de taille hypertriglycéridémique » (« hypertriglyceridemic waist »). L'utilisation de ce critère combiné montre une bonne concordance avec l'utilisation

des critères classiques du syndrome métabolique et nous a permis de sélectionner des sujets présentant des profils métaboliques assez similaires (108, 313, 314, 360, 361).

Concernant le choix du groupe témoin pour notre première étude clinique, nous aurions pu choisir une population présentant le même IMC que notre population cible, afin d'étudier les différences qui sont spécifiquement attribuables aux facteurs de risque cardiométabolique, indépendamment de la relation avec l'IMC. Bien que ce soit une question intéressante, elle apparaît comme trop spécifique voire artificielle, dans la mesure où les facteurs de risque cardiométabolique vont de pair avec l'augmentation de la masse grasse. Au niveau pratique, les sujets avec un tour de taille élevé présentent le plus souvent un surpoids. En outre, avec un groupe témoin de même IMC, mais sans tour de taille et sans triglycérides élevés, certains sujets auraient probablement affiché d'autres facteurs de risque cardiométabolique. Nous avons finalement choisi de rester simples et de représenter une situation réaliste, en choisissant des sujets témoins sans surpoids et sans tour de taille hypertriglycéridémique.

2. Choix du type de supplémentation

Au vu des informations apportées plus haut, notre choix s'est porté sur une supplémentation en arginine à faible dose, et donc sous une forme à libération prolongée, afin d'augmenter significativement l'argininémie sur le long terme pour un effet durable. La supplémentation a été réalisée avec une dose de 1,5 g de L-arginine (sous forme de la base libre), consommée trois fois par jour, soit au total une dose de 4,5 g/j de L-arginine. La forme à libération prolongée a été préalablement conçue dans l'objectif de mimer une mise à disposition qui permette une exposition à l'arginine couvrant approximativement 8 h, c.-à-d. avec un retour à la concentration basale environ 8 h après l'ingestion. Lors de la première étude, afin d'évaluer si la différence de mise à disposition jouait un rôle sur l'orientation métabolique de l'arginine, notamment sur son orientation vers la synthèse de NO, nous avons utilisé de l'arginine sous une forme à libération immédiate (sous forme de la base libre) comme comparateur.

B. Etude 1 : L'arginine orale, particulièrement sous une forme à libération prolongée, est utilisée plus efficacement pour la synthèse de monoxyde d'azote quand les sujets sains présentent des facteurs de risque cardiométabolique

Contexte et Objectif : La dysfonction endothéliale vasculaire, processus majeur initiant l'athérosclérose, est étroitement liée à l'altération de la synthèse et/ou biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), dont l'arginine est le précurseur. Chez des sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique, une supplémentation orale en arginine, à fortes doses (9-24 g/j), a un effet bénéfique sur des fonctions associées au NO. Cet effet semble dépendre de la dose et de l'augmentation de l'arginine plasmatique qui en résulte, mais aussi de la situation physiopathologique. Chez les sujets à risque, ce bénéfice pourrait être tangible dès de faibles doses (3-8 g/j), atteignables par l'alimentation, mais l'arginine alimentaire est mise à disposition lentement, tandis que les études évaluent des effets de supplémentation avec de l'arginine libre, mise à disposition très rapidement et de façon beaucoup plus brève. Cependant, aucune donnée ne permet de lier la mise à disposition de l'arginine et la synthèse de NO, en situation normale ou de risque cardiométabolique. L'objectif de cette étude était de comparer la biodisponibilité de l'arginine ingérée et son utilisation pour la synthèse de NO (1) selon qu'elle est consommée sous une forme à libération immédiate (LI) ou sous une forme à libération prolongée (LP), mimant la mise à disposition naturellement lente de l'arginine alimentaire, et (2) selon la présence ou non de facteurs de risque cardiométabolique chez les sujets sains étudiés.

Méthodes : Dans une étude selon un protocole croisé, avec répartition au hasard, nous avons comparé la biodisponibilité et l'utilisation pour la synthèse de NO d'arginine LP et LI (1,5 g, 3 fois par jour), consommée pendant une semaine, chez 15 sujets sains témoins et 12 sujets sains présentant un « tour de taille hypertriglycéridémique » (TTH). Nous avons pour cela utilisé de l'arginine marquée ($[^{15}\text{N}_2\text{-(guanido)}]$ -arginine) et des dosages isotopiques plasmatiques et urinaires pour suivre l'apparition de l'arginine ingérée dans la circulation systémique, déterminer l'apparition plasmatique (citrulline et urée) et l'excrétion urinaire (urée et nitrates) des produits de son métabolisme dans les voies NO synthase et arginase et ainsi déterminer sa conversion spécifique en NO.

Résultats et Discussion : Au niveau cinétique, comme attendu, les augmentations des concentrations plasmatiques en arginine ingérée, en arginine totale et en ornithine totale

étaient moins brutales et plus étalées après arginine-LP que LI. Au bilan, concernant les aires sous courbe (AUC) plasmatiques sur 24 h, l'AUC de l'arginine ingérée était moins importante après la supplémentation en arginine-LP que LI, tandis que les AUC de l'arginine et ornithine totales étaient peu variables selon la forme (LP ou LI) et la durée (premier ou dernier jour) de la supplémentation. Par ailleurs, l'utilisation de l'arginine ingérée pour la synthèse de NO était plus élevée chez les sujets TTH que chez les témoins, et elle était plus élevée avec la forme LP qu'avec la forme LI, en particulier chez les sujets TTH ($P < 0,05$). Chez les sujets TTH recevant la forme LP, l'utilisation pour la synthèse de NO était 32% plus élevée qu'avec la forme LI et 87% plus élevée que chez les sujets témoins recevant la même forme. Le fait que les concentrations de l'arginine ingérée soient moins importantes avec la forme LP que la forme LI indique que la conversion plus élevée de NO avec la forme LP ne peut pas être attribuée à une différence au niveau des concentrations circulantes en arginine, mais plutôt à un effet spécifique du profil cinétique de mise à disposition de l'arginine avec la forme LP, qui pourrait être plus efficace pour atteindre les compartiments éloignés où la NO synthase opère. De plus, l'arginine était moins dirigée (environ 10%) vers la voie d'hydrolyse de l'urée avec la forme lente (Annexe 1). Ainsi, une moindre compétition de la voie NO synthase avec la voie arginase pourrait expliquer, en partie, l'utilisation plus élevée de la forme lente par rapport à la forme libre d'arginine pour la synthèse de NO. Enfin, la meilleure utilisation de l'arginine pour la synthèse de NO en présence de facteurs de risque cardiométabolique laisse supposer que dans un contexte de risque cardiométabolique, la synthèse de NO est plus faible - sûrement en raison d'un mécanisme d'inhibition compétitive - mais aussi plus sensible à un apport exogène d'arginine.

Conclusion : L'utilisation de l'arginine ingérée pour la synthèse de NO est plus forte quand les sujets présentent des facteurs de risque cardiométabolique. Dans leur ensemble, nos résultats étayaient fortement l'idée que la diminution de la synthèse de NO lors de l'initiation du syndrome métabolique résulte d'une inhibition compétitive, ce qui la rend plus sensible à un apport exogène d'arginine. Dans ce contexte, une mise à disposition lente, de type nutritionnel, favorise nettement l'utilisation de l'arginine pour la synthèse de NO.

1. Eléments de choix méthodologique : méthode de suivi du devenir métabolique de l'arginine ingérée utilisée

Comme nous l'avons vu, le devenir de l'arginine ingérée peut-être étudié de façon spécifique et précise grâce à des techniques de marquages intrinsèques par des isotopes stables, qui font office de traceurs métaboliques. L'isotope lourd de l'azote (^{15}N) est classiquement utilisé en nutrition pour l'exploration du métabolisme de différents groupement azotés d'acides aminés (189). Les isotopes stables sont sans danger et peuvent être utilisés en étude clinique car ils ne se désintègrent pas et n'émettent donc pas de radiations (362). Les traceurs doivent posséder plusieurs propriétés afin de remplir correctement leur fonction (363) :

- Le métabolisme du traceur doit refléter le métabolisme du tracé.
- Le traceur ne doit pas entraîner de perturbations métaboliques.

L'orientation métabolique du traceur peut ainsi être suivie par mesure de son enrichissement dans différents pools de l'organisme par spectrométrie de masse.

Ainsi, lors de notre 1^{ère} étude clinique, nous avons utilisé la méthode des traceurs isotopiques, afin de suivre le devenir métabolique de l'arginine ingérée par les sujets au sein de différents pools azotés de l'organisme (acides aminés plasmatiques, nitrates urinaires, urée plasmatique et urée urinaire). La méthode requiert l'utilisation d'un marqueur de l'arginine ingérée : l'arginine marquée à l'azote 15 ($^{15}\text{N}_2$ -(guanido)]-arginine), qui est ajoutée en faibles quantités à la dose d'arginine ingérée, pour l'enrichir faiblement en azote 15. L'azote 15 est un isotope stable de l'azote, c.-à-d. qu'il n'engendre aucune émission radioactive, et ne modifie nullement les propriétés chimiques et biologiques du composé qui le contient. L'arginine marquée à l'azote 15 est donc absolument sans danger pour la santé. L'enrichissement en ^{15}N dans le guanidium de l'arginine ingérée lors de notre étude était de 8,5939 AT% (atome pourcent). Ainsi, une quantité connue du traceur (^{15}N contenu dans l'arginine) a été administrée aux volontaires. Les enrichissements isotopiques faibles en ^{15}N de l'arginine et de la citrulline plasmatiques ont ensuite été déterminés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse, et ceux des nitrates urinaires, de l'urée plasmatique et de l'urée urinaire, ont été déterminés grâce à un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (EA-IRMS). Pour cela des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués à intervalles réguliers sur 24 h. La mesure de l'enrichissement en ^{15}N de l'arginine et de la citrulline plasmatiques, ainsi que de l'urée plasmatique et urinaire sur 24 h; couplée à la mesure des concentrations en arginine et en citrulline plasmatiques, et

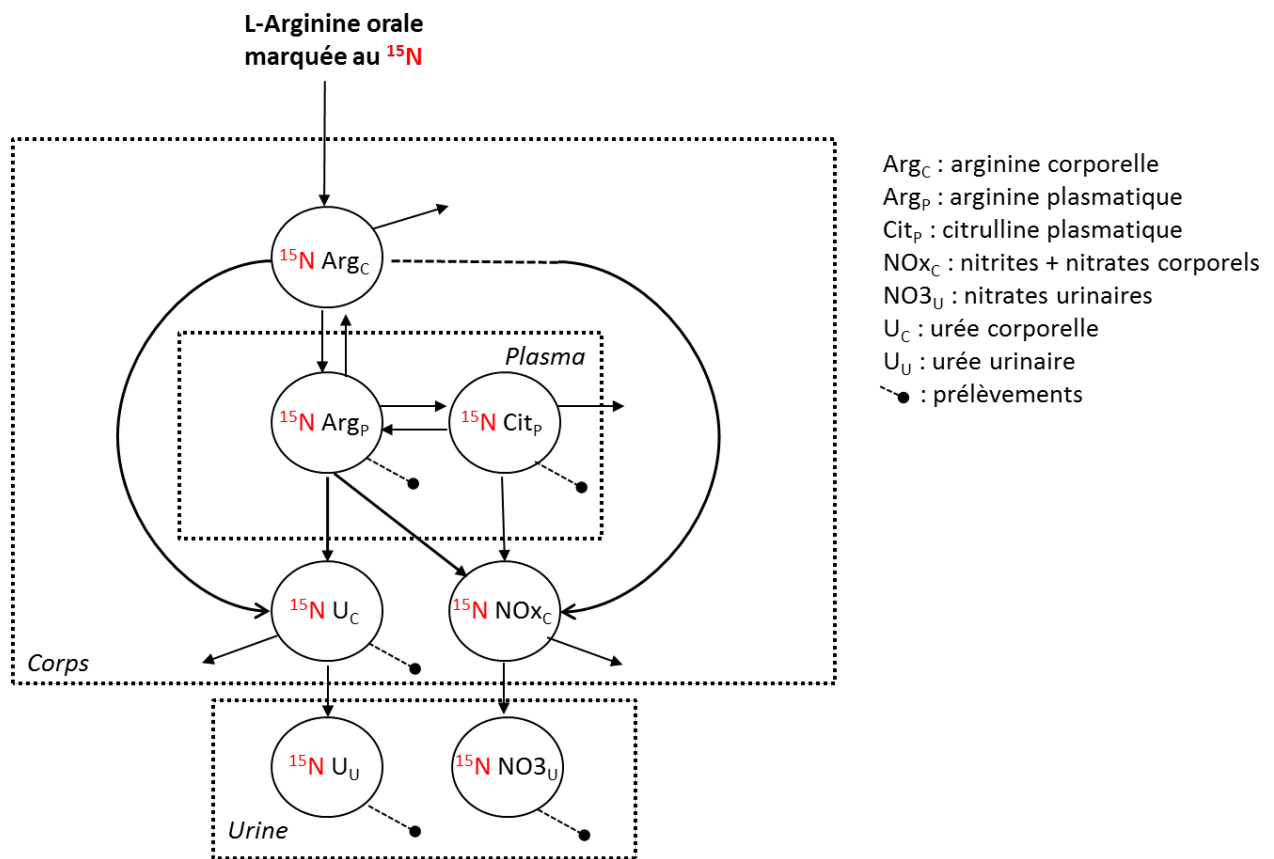


Figure 53 : Schéma de l'étude du devenir de l'arginine ingérée par la technique des traceurs

des concentrations plasmatique et urinaire en urée; nous ont permis, par le principe de dilution isotopique, de déterminer l'apparition plasmatique de l'arginine ingérée et l'apparition plasmatique et l'excrétion urinaire des produits de son métabolisme dans les voies NO synthase et arginase. De même, la mesure de l'enrichissement en ^{15}N des nitrates urinaires sur 24 h, nous a permis d'établir, par le principe de dilution isotopique, les quantités totales de nitrate provenant spécifiquement de l'arginine ingérée. La somme de l'excrétion des nitrates rapportée à la dose d'arginine ingérée nous a alors permis de déterminer la conversion relative de l'arginine ingérée en NO (Figure 53).

2. Article 1

Oral arginine, particularly when made available slowly, is used more efficiently for nitric oxide synthesis in subjects with cardiometabolic risk factors: a randomized controlled study.

Ambre Deveaux, Hélène Fouillet, Klaus J Petzke, Dominique Hermier, Etienne André, Pierre Bunouf, Frédérique Lantoiné-Adam, Robert Benamouzig, Véronique Mathé, Jean-François Huneau, and François Mariotti.

J Nutr. 2016 Jun 8. pii: jn231910. [Epub ahead of print].

A Slow- Compared with a Fast-Release Form of Oral Arginine Increases Its Utilization for NO Synthesis in Overweight Adults with Cardiometabolic Risk Factors in a Randomized Controlled Study^{1–3}

Ambre Deveaux,⁴ Hélène Fouillet,⁴ Klaus J Petzke,⁵ Dominique Hermier,⁴ Etienne André,⁶ Pierre Bunouf,⁶ Frédérique Lantoin-Adam,⁶ Robert Benamouzig,⁴ Véronique Mathé,⁴ Jean-François Huneau,⁴ and François Mariotti^{4*}

⁴UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, France;

⁵German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke, Nuthetal, Germany; and ⁶Institut de Recherche Pierre Fabre, Boulogne-Billancourt, France

Abstract

Background: Oral L-arginine supplements can have a beneficial effect on nitric oxide (NO)-related functions when subjects have cardiovascular disease risk factors.

Objective: The study was designed to determine the utilization for NO synthesis of oral L-arginine as a function of the cardiometabolic risk and the speed of absorption by comparing immediate-release arginine (IR-Arg), as in supplements, and sustained-release arginine (SR-Arg), which mimics the slow release of dietary arginine.

Methods: In a randomized, single-blind, 2-period crossover, controlled trial (1 wk of treatment, >2 wk of washout), using [¹⁵N-¹⁵N-(guanidino)]-arginine for the first morning dose, we compared the bioavailability (secondary outcome) and utilization for NO synthesis (primary outcome) of 1.5 g IR- and SR-Arg 3 times/d in 12 healthy overweight [body mass index (BMI; in kg/m²): 25–30] adults with the hypertriglyceridemic waist phenotype [HTW; plasma triglycerides (TGs): >150 mg/dL; waist circumference: >94 cm (men) or >80 cm (women)] and 15 healthy control adults (CON; BMI: 18.5–25; no elevated TGs and waist circumference).

Results: Plasma oral arginine areas under the curve were lower after supplementation with SR-Arg than with IR-Arg (112 ± 52.3 and 142 ± 50.8 μmol · h/L; *P* < 0.01). The utilization of oral arginine for NO synthesis was 58% higher in HTW subjects than in CON subjects and higher with SR-Arg than with IR-Arg (*P* < 0.05 both), particularly in HTW subjects (group-by-treatment interaction, *P* < 0.05). In HTW subjects administered the SR form, utilization for NO synthesis was 32% higher than with the IR form and 87% higher than in CON subjects who were administered the SR form.

Conclusion: In overweight adults with the HTW phenotype, a slow- compared with a fast-release form of oral arginine markedly favors the utilization of arginine for NO synthesis. The utilization of low-dose, slow-release arginine for NO synthesis is higher in overweight adults with the HTW phenotype than in healthy controls, suggesting that the sensitivity of NO synthesis to the dietary arginine supply increases with cardiometabolic risk. The trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT02352740. *J Nutr* doi: 10.3945/jn.116.231910.

Keywords: nitric oxide, arginine metabolism, dietary arginine, isotopic methods, metabolic syndrome

Introduction

NO is an important mediator that plays a key role in vascular homeostasis (1, 2). Endothelial dysfunction that results from impaired NO synthesis and/or bioavailability is considered to be

a central feature in the initiation of metabolic syndrome and atherosclerosis (1–5). Oral L-arginine, taken as an oral dietary supplement, is used for NO synthesis, and such supplementation can modulate NO-related physiologic functions (6–11).

¹ Supported by a grant from Pierre Fabre Research Institute. AD received PhD fellowship funding through this grant.

² Author disclosures: A Deveaux, H Fouillet, KJ Petzke, D Hermier, R Benamouzig, V Mathé, J-F Huneau, and F Mariotti, no conflicts of interest. E André, P Bunouf, and F Lantoin-Adam are employees of Pierre Fabre Research Institute.

³ Supplemental Figures 1–9, Supplemental Methods 1–3, and Supplemental Tables 1 and 2 are available from the “Online Supporting Material” link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org>.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: francois.mariotti@agroparistech.fr.

The literature offers a large amount of data on the beneficial effects of high doses of arginine (usually between 9 and 21 g/d) in patients presenting with cardiovascular disease or subjects with risk factors for cardiovascular disease (11–14). In particular, arginine supplementation was shown to improve endothelial function if this is impaired at baseline (12). Because oral arginine is largely available to the general circulation, its supplementation results in a marked elevation of plasma arginine, even at a low dose (i.e., a few grams). In subjects with cardiovascular disease risk factors, the benefits of arginine supplementation may be tangible at a low amount of supplementation (12–15), which can be achieved through its intake through the diet, suggesting that the daily nutritional intake may affect vascular health.

Because dietary arginine is ingested in the form of protein, it is absorbed and made available slowly, as is the case for any amino acid ingested as protein through regular meals (16, 17). This slow “nutritional” release of arginine can be mimicked by pharmaceutical sustained-release (SR)⁷ formulations of arginine supplements (17, 18). Such a slow absorption rate, compared with that of arginine as found in an immediate-release (IR) form, should favor a sustained elevation of plasma arginine and may also affect its metabolic utilization. Indeed, a slow absorption rate may limit the activation of metabolic disposal and may favor utilization in other pathways (16, 17, 19).

In contrast to the large body of positive results in subjects with cardiovascular disease risk factors, only a few studies were conducted in healthy subjects without cardiovascular disease risk factors and who were administered low doses of arginine, and these studies were negative for significant changes to NO-related functions (6, 12, 20). From this literature as a whole, it was hypothesized that a decrease in basal total NO synthesis in subjects at risk of cardiovascular diseases such as individuals with cardiometabolic risk (5, 21–25) could be overcome by arginine supplementation, there being different possible underlying mechanisms (8, 13, 26–33). However, no direct, in vivo data are available in humans to support the hypothesis that oral/dietary arginine is used differently for NO synthesis in subjects with cardiovascular disease risk factors.

With the use of [¹⁵N₂-(guanidino)]-labeled dietary arginine, the present study was designed to investigate the bioavailability and utilization of dietary L-arginine for NO synthesis as a function of the kinetics of release and to test the hypothesis that this utilization would be higher in adults with metabolic risk factors [in this case, healthy overweight adults with the hypertriglyceridemic waist (HTW) phenotype (34–39)] than in healthy control (CON) adults.

Methods

Study population

Sixteen healthy CON subjects and 16 healthy overweight subjects with the HTW phenotype were recruited for this study. The inclusion criteria for the CON subjects were age between 18 and 60 y, BMI (in kg/m²) of 18.5–25, waist circumference <94 cm for men or <80 cm for women, and fasting TG concentrations <150 mg/dL. For the HTW subjects, the inclusion criteria were age between 18 and 60 y, BMI of 25–30, waist circumference >94 cm for men or >80 cm for women, and fasting TG concentrations >150 mg/dL. The main noninclusion criteria in both groups were obesity (BMI >30), systolic blood pressure >150 mm Hg or diastolic blood pressure >90 mm Hg, and any disease. The full list of noninclusion criteria can be found in **Supplemental Methods 1**.

Recruitment and ethical aspect

The subjects were recruited between October 2012 and February 2013 by the Human Research Center at Avicenne Hospital (CRNH Ile-de-France Human Research Center), and the intervention was conducted from March 2013 to May 2013. The study was approved by the Ile-de-France XI Institutional Review Board and was authorized by the French agency (French National Agency for Medicines and Health Products Safety) under the administrative supervision of the French Ministry for Health. The trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT02352740. The recruitment is detailed in **Supplemental Methods 1** and **Figure 1**.

Design and interventions

This was a randomized, single-blind, 2-period crossover, controlled study with 1-wk treatment periods and a washout period of ≥2 wk. The sample size was based on a power calculation, with the conversion of oral arginine into NO as the primary outcome. A total of 26 subjects was estimated to provide 80% power to detect a 20% effect of the treatment with $\alpha = 0.05$, based on variability data from a previous crossover study in healthy volunteers with no risk factors (40). From the expected dropout rate, the number of subjects to be randomly assigned was set at 32. The randomization scheme is detailed in **Supplemental Methods 1**.

The study treatments were supplied by Pierre Fabre Médicament as 3 sets of 3 identical capsules (i.e., 9 capsules/d) to be taken each day during all the study periods. After an overnight fast, the subjects were studied for 24 h on 4 occasions as follows: on the first and the last days of both treatment periods. During these periods, they were administered, in a randomized order, 1.5 g IR-Arg or SR-Arg base, as capsules, 3 times/d (i.e., 4.5 g/d), this being a dose similar to the mean spontaneous dietary intake (~5–6 g/d) (41). Note that the use of arginine base and not arginine hydrogen chloride is unlikely to have any impact on the pH of the intestinal milieu at such a low dose and when the administration of arginine occurs 10 min only before ingestion of a meal. During the session on the last day of supplementation, the first daily intake of arginine was labeled with L-[¹⁵N-¹⁵N- (guanidino)]-arginine hydrogen chloride (Ajinomoto). The 2 treatments (i.e., SR-Arg and IR-Arg) contained the same amount of L-arginine, but the nature of the gelatin envelope of the capsule in the SR formulation results in a slow release of arginine, as shown by the in vitro dissolution test (**Supplemental Figure 1**). The treatments were matched to a coded numerical identifier so that both research staff and participants were blinded to the treatments assigned; this information was only accessible to the principal investigator and the research director. The subjects were instructed to adhere to their usual diet and to maintain their usual levels of activity during the course of the study. To assess their compliance, the subjects were asked to return any unused capsules at each visit.

Meal protocol

The subjects were given breakfast 10 min after the first dose of arginine (set at time zero) in the form of a low-protein food (low-protein wafers) and a sweet drink (orange juice). For the rest of the day-long session, the subjects were administered calibrated meals with a fixed and nutritionally balanced composition, at fixed times (4.5 h and 11 h after time zero). These meals were made with foods obtained from food stores. The subjects were asked to eat all the food supplied at each meal during the sessions, which they did. The meal compositions, arginine contents, and total energy intake during the day are detailed in **Supplemental Table 1**.

Blood and urine sample collection and assays

Blood was drawn through a catheter inserted into a superficial arm vein, and samples were collected before the first arginine intake (fasting) and then 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, and 24 h thereafter. During each last day of supplementation, urine samples were also collected at 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h after the first arginine intake. All samples were portioned and stored at –20°C and –80°C for later analysis.

Plasma markers of endothelial function. Fasting plasma concentrations of vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1,

⁷ Abbreviations used: ADMA, asymmetric dimethyl-arginine; CON, control; HTW, hypertriglyceridemic waist; IR, immediate release; SR, sustained release.

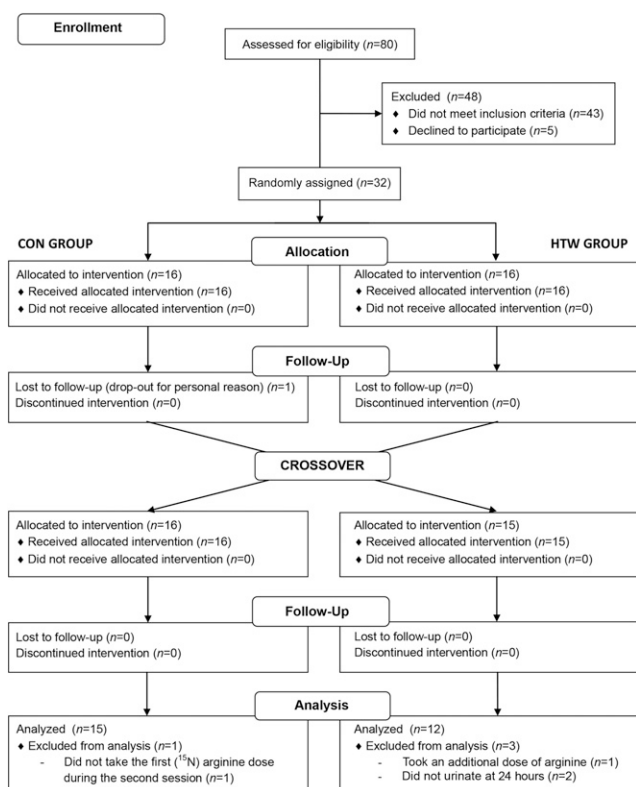


FIGURE 1 Diagram of subject flow and reasons for exclusions. CON, control; HTW, hypertriglyceridemic waist.

E-selectin, and P-selectin were determined with a custom-made mixed assay kit with antibody-coated beads (Human Luminex screening Assay; intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, R&D Systems) with the use of the Luminex xMAP technology platform for the multiplexing of immunochemical bioassays (BioPlex 200 with high-throughput fluidics system; Bio-Rad).

Lipids, insulin, glucose, and ADMA. The fasting lipid profile (TGs, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol) and insulin and glucose were assayed with standard clinical biochemical analyzers. We also assayed TGs at 4, 6, 8, and 12 h with the use of the Triglyceride GPO-PAP Kit (RANDOX). The HOMA-IR was calculated as $[\text{insulin (pmol/L)} / 6.945] \times \text{glucose (mmol/L)} / 22.5$. The number of risk factors associated with metabolic syndrome was calculated according to the consensus criteria for clinical diagnosis (34). Fasting asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) concentrations were measured with an ELISA assay (DLD Diagnostika GmbH).

Kinetic profiles of plasma amino acid concentrations and ratios over 24 h

Plasma amino acid concentrations were assayed by ultra-performance liquid chromatography with UV and mass detection, as previously described (42). Arginine bioavailability was further estimated by calculating the global arginine bioavailability ratio [defined as the ratio of arginine to (ornithine+citrulline)] and the ratios of arginine to ornithine and arginine to ADMA (43, 44).

Nitric oxide synthesis and plasma arginine originating from oral arginine

Plasma ^{15}N arginine and urinary $^{15}\text{NO}_3$ enrichments. ^{15}N arginine enrichment was analyzed with a specific gas chromatography–combustion isotope ratio mass spectrometry method that we recently described in full elsewhere (11). Nitrate was extracted from urine samples by adapting previously described methods (40).

Urinary nitrate and creatinine concentrations over 24 h. Urinary nitrate concentrations were determined by chemiluminescence (45), according to the manufacturer's instructions (NOAi280; Sievers) with analysis of the signal by a computerized integrator (Origin 7.0; Microcal Software, Inc.). Urinary creatinine was determined with a commercial kit with the alkaline picrate method (Créatinine Cinétique kit; Biomérieux).

Calculations. All AUCs were calculated with the trapezoidal rule. The specific fraction of plasma arginine that originated from oral arginine (hereinafter referred to as “plasma oral arginine”) and urinary nitrate that specifically originated from oral arginine (which is used to calculate the utilization of oral arginine for NO synthesis) were calculated with standard isotopic dilution equations, which are detailed in **Supplemental Method 2**.

Analysis set and outcomes

The data analysis was conducted on the per protocol sample and as a secondary and confirmatory analysis on the intention-to-treat sample.

The utilization of oral arginine for NO synthesis was the primary outcome, and the bioavailability and the other analyses were secondary outcomes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SAS (version 9.3; SAS Institute). Data are reported as means $\pm$ SEMs. Significance was set at $P < 0.05$. Differences in baseline characteristics, between the CON group and the HTW group, were analyzed with Student's t test, except for the sex variable, which was based on χ^2 test. Data were analyzed with mixed models (PROC MIXED) for repeated measurements with covariance structure modeling. For kinetic data collected during each of the 4 sessions (i.e., plasma amino acids), 2 separate analyses were performed, one for sessions before supplementation and the other for sessions after supplementation. Treatment and time were considered as repeated factors on the subject for covariance structure modeling. The subject was fitted as a random effect, and the group (CON or HTW subjects), the period (first or second), and group-by-treatment, group-by-time, treatment-by-time, treatment-by-period (to test for the possible existence of a carryover), and group-by-treatment-by-time interactions were also introduced into the model. Similar mixed models, excluding time-related factors, were used to analyze the summarized data independent of time (e.g., AUC data). In a further analysis for potential confounding with a difference in sex in the CON and HTW groups, we introduced a sex cofactor in the mixed model to explain the conversion of arginine into NO. The Hochberg-Bonferroni method was used to correct for multiplicity in the comparisons between treatments at each time point. Finally, the comparison between IR-Arg and SR-Arg after supplementation in the HTW subjects was tested according to a preplanned contrast in this mixed model.

In addition to the analysis of the main outcome (i.e., the utilization of oral arginine for NO synthesis), we also analyzed the partly imbalanced data from 31 subjects, without and with imputation for 2 subjects, under an intention-to-treat approach. This approach is detailed in **Supplemental Method 3**.

Results

Of the 32 subjects who were randomly assigned to treatment, 31 completed the study (Figure 1). Four subjects presented major deviations from the protocol. Accordingly, we analyzed the data from 27 subjects: 15 CON (6 men and 9 women) and 12 HTW (7 men and 5 women), whose characteristics are shown in **Table 1**. The principal results obtained with the intention-to-treat approach were similar and confirmed the main approach (**Supplemental Method 3**). Compliance was excellent ($>96\%$ for all subjects during all periods) as determined by the return of capsules. Until the end of the follow-up period, no adverse effects were reported.

Oral arginine availability and plasma arginine

Kinetics of oral arginine in plasma. The amount of intact oral arginine found in plasma (i.e., plasma arginine originating directly

TABLE 1 Baseline characteristics at the first session of CON subjects and subjects with the HTW phenotype¹

	CON (n = 15)	HTW (n = 12)	P ²
Men, %	40	58	<0.05
Age, y	33.2 ± 12.4 (21.0–54.0)	41.5 ± 8.82 (30.0–58.0)	NS
Weight, kg	63.4 ± 10.5 (49.0–80.0)	80.7 ± 10.9 (66.0–100)	<0.001
Height, m	1.71 ± 0.0849 (1.57–1.86)	1.73 ± 0.105 (1.55–1.87)	NS
Waist, cm	80.1 ± 8.72 (69.0–98.0)	99.5 ± 5.07 (93.0–107)	<0.0001
BMI, kg/m ²	21.7 ± 2.07 (18.4–25.2)	26.9 ± 2.33 (23.2–30.2)	<0.0001
SBP, mm Hg	118 ± 11.4 (100–142)	126 ± 10.0 (109–140)	NS
DBP, mm Hg	69 ± 8.7 (58–92)	76 ± 8.6 (65–97)	<0.05
Plasma lipids			
TGs, mmol/L	0.68 ± 0.31 (0.31–1.6)	1.4 ± 0.56 (0.55–2.3)	<0.001
Postmeal TG AUCs, μmol · h/L	10 ± 4.7 (4.6–23)	21 ± 10 (8.3–39)	<0.01
TC, g/L	1.8 ± 0.38 (1.2–2.4)	2.2 ± 0.55 (1.0–3.4)	<0.05
LDL cholesterol, g/L	1.1 ± 0.27 (0.60–1.5)	1.4 ± 0.47 (0.54–2.6)	NS
HDL cholesterol, g/L	0.5 ± 0.2 (0.3–0.9)	0.4 ± 0.1 (0.2–0.6)	<0.05
Glucose metabolism			
Plasma glucose, mmol/L	4.7 ± 0.51 (3.8–5.6)	5.0 ± 0.56 (4.4–6.7)	NS
Plasma insulin, pmol/mL	61.8 ± 61.3 (20.9–254)	84.3 ± 32.0 (39.8–149)	NS
HOMA-IR	2.0 ± 2.3 (0.61–9.3)	2.8 ± 1.2 (1.3–5.4)	NS
Plasma markers of endothelial function, ng/mL			
ICAM-1	142 ± 65.3 (65.0–301)	140 ± 75.4 (48.3–324)	NS
VCAM-1	744 ± 295 (448–1700)	566 ± 151 (333–854)	NS
E-selectin	34.6 ± 21.8 (9.47–89.9)	41.4 ± 12.2 (22.8–60.3)	NS
P-selectin	60.3 ± 14.5 (33.3–82.7)	65.2 ± 2.94 (49.1–78.8)	NS
Arginine metabolism			
Plasma arginine, μmol/L	88.8 ± 8.25 (47.7–148)	86.4 ± 5.60 (60.3–127)	NS
Plasma citrulline, μmol/L	28.3 ± 1.64 (17.5–41.8)	30.2 ± 2.99 (18.9–55.5)	NS
Plasma ornithine, μmol/L	40.9 ± 2.09 (28.8–55.7)	45.0 ± 3.97 (18.6–71.7)	NS
Plasma ADMA, μmol/L	0.34 ± 0.12 (0.15–0.57)	0.41 ± 0.16 (0.21–0.72)	NS
Arginine/ADMA	279 ± 29.6 (153–480)	235 ± 24.0 (116–401)	NS
Arginine/ornithine	2.2 ± 0.17 (1.1–3.5)	2.1 ± 0.31 (1.3–5.2)	NS
GABR	1.3 ± 0.083 (0.68–1.8)	1.2 ± 0.14 (0.71–2.6)	NS
Risk factors associated with MS, ³ n	0.60 ± 0.74 (0–2.0)	2.2 ± 1.1 (1.0–4.0)	<0.001

¹ Values are means ± SDs; ranges in parentheses. NS, $P \geq 0.05$. ADMA, asymmetric dimethyl-arginine; CON, control; DBP, diastolic blood pressure; GABR, global arginine bioavailability ratio (defined as ratio of arginine to ornithine+citrulline); HTW, hypertriglyceridemic waist; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; MS, metabolic syndrome; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

² Based on a Student's *t* test between the CON and HTW subjects, except for men (%) when it was based on a χ^2 test.

³ Calculated according to the criteria for clinical diagnosis, and their categorical cutoffs were the following: elevated waist circumference (>94 cm for men or >80 cm for women), elevated TGs (≥ 150 mg/dL), reduced HDL cholesterol (<40 mg/dL for men and < 50 mg/dL for women), elevated SBP (≥ 130 mm Hg), and elevated fasting glucose (≥ 100 mg/dL).

from the oral arginine supplement, having kept its original guanidino moiety) as a function of time is presented in **Figure 2**. As expected from construction of the formulation, plasma oral arginine concentrations increased less but over a longer period after consumption of the SR form than after the IR form (treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$). SR-Arg appeared later in the plasma than IR-Arg and remained there for ~ 8 h. Oral arginine reached the highest concentrations 1 h after ingestion of the IR form and 4 h after ingestion of the SR form.

Overall, oral arginine concentrations in plasma were lower with the SR form than with the IR form (treatment effect, $P < 0.0001$) with 24-h AUCs of 112 ± 52.3 and 142 ± 50.8 mmol · h/L after SR-Arg and IR-Arg, respectively ($P < 0.01$).

Kinetics of plasma total arginine concentration over 24 h.

As expected, plasma total arginine concentrations (**Figure 3**) was steadier after consumption of the SR form than after the IR form (treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$). After the intake of

IR-Arg, the dynamics of change were more pronounced, with 3 peaks corresponding to the 3 oral arginine intakes (i.e., the capsules and arginine from the protein in the meals consumed 10 min later). The general shapes of the curves and AUCs were quite similar when comparing the first and last days of supplementation. The overall effect of supplementation (i.e., the difference between the first and last days of supplementation, regardless of group and treatment) was to elevate fasting (0 h) plasma concentrations (from 90.8 ± 3.49 to 107 ± 4.05 μmol/L; supplementation effect, $P < 0.01$) but not to increase the AUCs.

The contribution of oral arginine supplements to changes in plasma total arginine over 24 h, calculated as the ratio of 3 times the AUC of oral arginine to the incremental 24-h AUC of total arginine, was estimated to be $41\% \pm 3\%$ overall.

Fasting values and kinetics of arginine-related amino acid concentrations over 24 h. Data about other amino acids linked to arginine metabolism (citrulline, ornithine, glutamate,

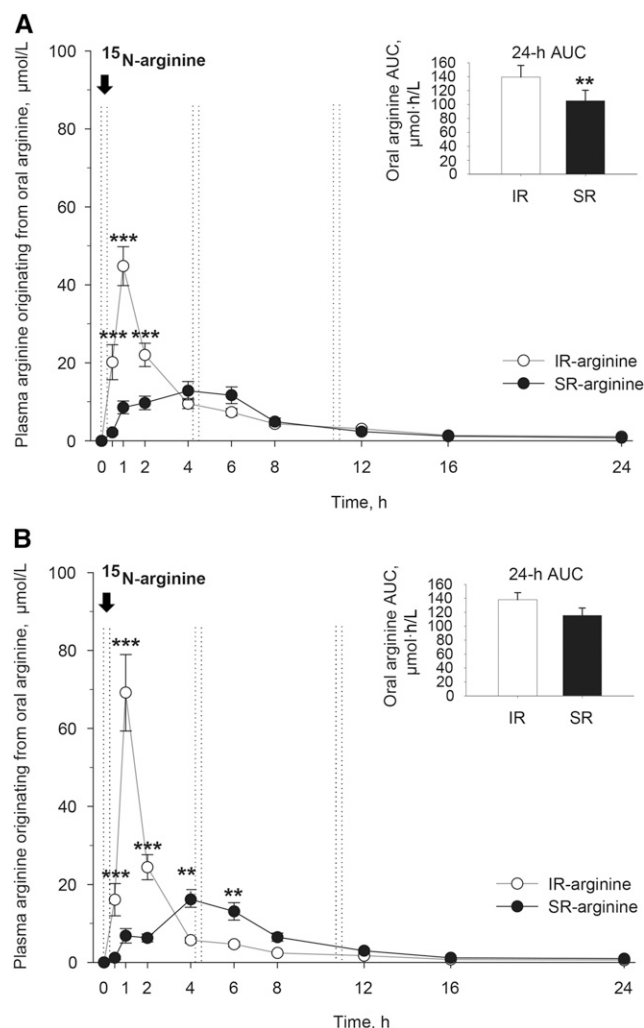


FIGURE 2 Kinetics of plasma arginine that originated from oral arginine, labeled with [$^{15}\text{N}_2$ -guanidino]-arginine and ingested in the morning, and AUC values in the CON subjects ($n = 15$; A) and the subjects with the HTW phenotype ($n = 12$; B) who were administered IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The 3 series of 2 vertical lines indicate successive arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 min later. Only the first dose of arginine ingested in the morning was labeled as indicated by the arrow. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures): group-by-time interaction, $P < 0.05$; group-by-treatment-by-time interaction, $P < 0.001$; time, treatment, and treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$; treatment effect on AUCs, $P < 0.01$. **, ***Differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison of IR- and SR-arginine after supplementation in subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. CON, control; HTW, hypertriglyceridemic waist; IR, immediate-release form; SR, sustained-release form.

glutamine, and proline) and ratios related to arginine bioavailability (e.g., global arginine bioavailability ratio) are shown in **Supplemental Table 2** and **Supplemental Figures 2–8**. Similar to what occurred with plasma arginine, plasma ornithine concentrations (**Supplemental Figure 3**) increased less but over a longer period after consumption of the SR form than after the IR form (treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$).

Utilization of oral arginine for NO synthesis

The utilization of oral arginine for NO synthesis was higher with SR-Arg than with IR-Arg (treatment effect, $P < 0.05$), was higher

in the HTW subjects than in the CON subjects (group effect, $P < 0.05$), and also had a strong group-by-treatment interaction ($P < 0.05$) (**Figure 4**). Thus, in the HTW subjects, but not in the CON subjects, the utilization of oral arginine for NO synthesis was greater with SR-Arg than with IR-Arg ($P < 0.01$). In the HTW subjects, the comparative increase in this utilization between IR-Arg and SR-Arg was $32\% \pm 14\%$. Conversion of the SR form was 87% higher in the HTW subjects than that in the CON subjects.

In the HTW subjects, the cumulated excretion of nitrate specifically originating from oral arginine (**Supplemental Figure 9**) showed that the total difference in the NO conversion of oral arginine from the IR and SR forms was explained by late differences in the urinary excretion profile (after 8 h). The slopes were significantly different (treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$). The cumulative excretion of creatinine did not differ as a function of treatments and groups (data not shown).

Discussion

The main finding of this study is that the utilization of oral arginine for NO synthesis is higher in adults with the HTW phenotype than in the CON adults, and this effect is more marked when oral arginine is absorbed and made available slowly.

Oral arginine contribution to plasma total arginine concentrations. The pharmacokinetic data collected during this study showed that arginine intake, in the form of meal arginine and oral arginine supplements, largely affects plasma arginine concentrations in the fasting state and over 24 h of intake. We showed that an arginine supplementation, consisting in an approximate doubling of the usual mean arginine intake in adults, resulted in an important increase in plasma total arginine concentrations in the fasting state. Over 24 h, plasma arginine exhibited marked changes after the intake of meal protein and arginine supplements, and supplementation contributed largely to these changes. Our data characterized the dynamics of plasma arginine changes over 24 h as a function of the release form of arginine under a controlled dietary intake.

IR-Arg or SR-Arg and plasma arginine kinetics. The kinetics of oral arginine in plasma, as traced with ^{15}N labeling, differed markedly between the IR and SR forms; as expected, the SR form appeared much later in the plasma, which is consistent with a release mimicking that of arginine contained in dietary proteins (17). The kinetic profiles of plasma total arginine were also markedly different after SR than after IR. However, we also found that the plasma total arginine AUCs over 24 h were globally similar regardless of the form used, whereas the amount of oral arginine found in the plasma (as estimated from the AUCs) was lower after SR than after IR. Such differences in plasma arginine concentrations after supplementation may have resulted from differences in the rates of plasma arginine appearance and/or disposal. In addition to oral arginine in its intact form (as traced here), there are other contributors to plasma arginine during the postprandial period, including arginine that originated from dietary proteins, arginine synthesized from other dietary amino acids, endogenously synthesized arginine, and, finally, recycled oral arginine (i.e., oral arginine that has lost its original guanidino group). This may have contributed to smoothing the kinetics of plasma arginine over 24 h.

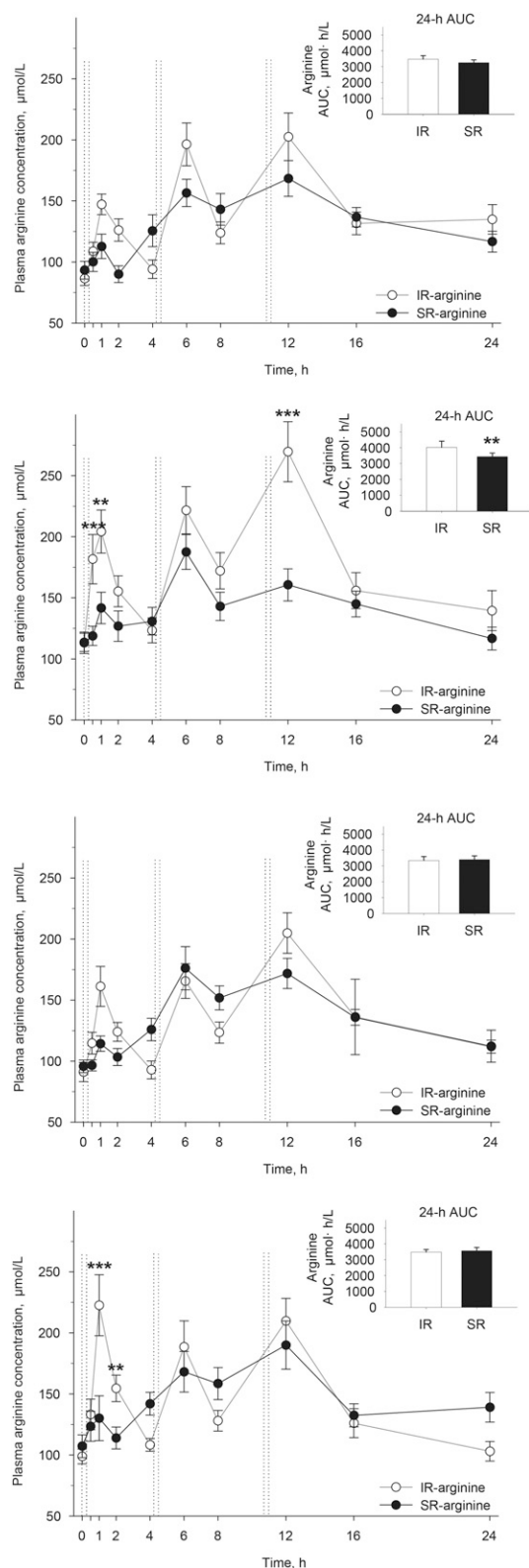


FIGURE 3 Kinetics of plasma total arginine over 24 h and AUC values in the CON subjects ($n = 15$; A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n = 12$; C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-d supplementation period (B and D), who were administered IR-arginine and SR-arginine treatments each for 1 wk. The 3 series of 2 vertical lines indicate the 3 arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 min later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: time and treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$; after 1 wk of supplementation: treatment, $P < 0.05$; group-by-

Higher utilization of oral arginine for NO synthesis in HTW subjects. Although arginine concentrations should not be rate limiting from the K_m of NO synthases for arginine, both arginine depletion and oral arginine supplementation were shown to modulate NO-related physiologic functions (6–10, 46, 47). This phenomenon is referred to as the “arginine paradox.” In subjects with cardiometabolic risk factors, the basal total synthesis of NO was reported to be reduced (1, 3–5), and in the present study we indeed showed a higher utilization of oral arginine for NO synthesis in adults with the HTW phenotype. We conclude that in the context of cardiometabolic risk, total NO synthesis is lower but more sensitive to an exogenous arginine supply. This would explain why positive results about the benefits of arginine supplementation have mostly been reported in patients who have a disease or are at risk and are presumably affected by a reduction in basal total NO synthesis. This upregulation of exogenous arginine utilization lends credence to the idea that the decrease in total NO synthesis in a context of cardiovascular disease risk results from activation of a competitive pathway or competitive-like inhibition, which could be overcome by increasing the arginine supply. By contrast, in fully healthy subjects, total NO synthesis would result from fine-tuning and be little sensitive to variations in the standard dietary arginine intake with which it is naturally confronted (11, 40). We could not ascribe the difference in arginine utilization in our study to a difference in baseline plasma arginine or markers of baseline arginine metabolism, which did not differ between groups, as was reported in other conditions (48).

Numerous mechanisms for a competitive-like inhibition of total NO synthesis are proposed, including changes to the compartmentation of arginine metabolism, competition with arginase activity, or an increase in direct competitive inhibitors of NO synthase such as ADMA (27–33, 49). During this study, ADMA was probably not involved because plasma ADMA concentrations did not differ between the HTW and CON subjects. However, because the intracellular compartmentation of ADMA and arginine is highly complex, a role for ADMA in the competitive inhibition of basal total NO synthesis in the HTW subjects cannot be completely disregarded. From the data available to us, it was impossible to determine the mechanism involved.

Higher utilization of the SR form for NO synthesis. Because the SR form induced a lower plasma oral arginine AUC, the higher conversion of NO with the SR form could not be ascribed to a difference in the overall concentration of circulating arginine, but rather to a specific effect of the kinetic profile with SR. Because the higher utilization of SR-Arg for NO synthesis was significant in the HTW (but not in the CON) subjects, the specific kinetic profile of the SR form (with arginine slowly made available) would have been particularly efficient in overcoming competitive inhibition of the NO synthase pathway. There may be different explanations for this specific effect of “slow”

treatment-by-time interaction, $P < 0.001$; time and treatment-by-time interaction, $P < 0.0001$. Treatment-by-group and treatment-by-period interactions on AUCs, $P < 0.05$. Supplementation effect on fasting values, $P < 0.05$. **, ***Differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR- and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. CON, control; HTW, hypertriglyceridemic waist; IR, immediate-release form; SR, sustained-release form.

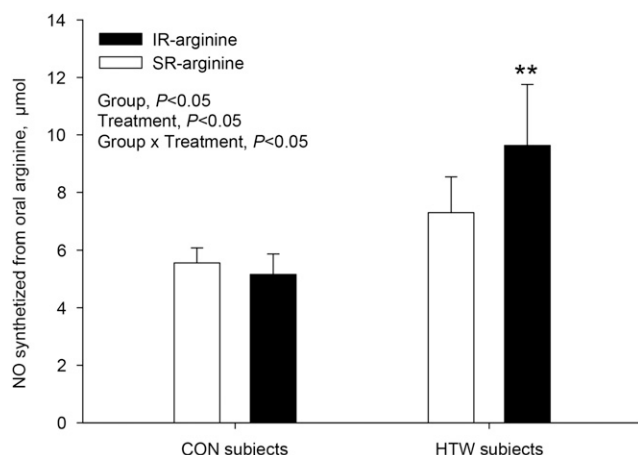


FIGURE 4 Amounts of NO synthesized from oral arginine, calculated as the amount of urinary nitrate excreted in the urine over 24 h and originated from oral IR-arginine or SR-arginine, labeled with [$^{15}\text{N}_2$ -(guanidino)]-arginine, after 1 wk of supplementation in the CON subjects ($n = 15$) and the subjects with the HTW phenotype ($n = 12$) who were administered IR-arginine and SR-arginine treatments each for 1 wk. Data are means $\pm$ SEMs. **Differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR- and SR-arginine after supplementation in subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P < 0.01$. CON, control; HTW, hypertriglyceridemic waist; IR, immediate-release form; SR, sustained-release form.

arginine. One hypothesis, which would fit with the well-known tight and complex compartmentation of arginine metabolism (11), is that slow arginine may be more efficient in reaching the distant compartments where NO synthase operates. Such a hypothesis is also supported by our finding of a delayed difference in the excretion of labeled nitrate with SR compared with IR. A slow absorption rate may also limit activation of the metabolic disposal of arginine, thereby favoring its utilization in other pathways, including that of NO synthesis (6–11).

Study limitations and strengths. This study has certain limitations and strengths. The sample size ($n = 31$) remained limited, but the crossover design gave adequate power to the study. Furthermore, one strength of this study is that it applied a state-of-the-art approach to trace the bioavailability and utilization of oral arginine with the use of robust non-steady state equations, during a controlled interventional study that included 24-h study sessions in humans. Note that there was a slightly higher percentage of men among the HTW subjects (58% compared with 40% in the CON group) which may be viewed as a limitation. However, this difference could not explain the higher conversion of oral arginine into NO in the HTW group. In the literature, evidence suggests that NO synthesis is indeed lower in healthy men than in healthy women (50). We also found no effect of sex when tested by addition in the statistical models.

Conclusions. We have shown that the utilization of oral arginine for NO synthesis is higher in otherwise healthy adults with cardiometabolic risk factors. This would explain why positive results about the physiologic benefits of arginine supplementation have mostly been evidenced in subjects with cardiovascular disease risk factors. Our results also support the

notion that the reduction in basal total NO synthesis in subjects with metabolic syndrome results from competitive-like inhibition, that is, a condition in which a higher supply of substrate could fuel the metabolic pathway. Finally, we have shown that the kinetics of arginine are a determining factor in its utilization for NO synthesis in adults with cardiometabolic risk factors, with a higher utilization rate when arginine is absorbed slowly, which is what happens naturally with dietary arginine.

Acknowledgments

We thank Marie-Claude Amard and Gheorghe Airinei for organizing the experimental sessions at the Clinical Research Center and for important practical help, Caroline Leroy and Nadezda Khodorova for assistance with biochemical and IRMS analyses, Nadine Mézière and Colette Mustière (UMR 1348 PEGASE) for amino acid analysis, and Eric Débier (Rohm & Hass) for the gift of the special ion-exchange resin for nitrate extraction. FM designed the research; AD, HF, DH, EA, PB, FL-A, RB, J-FH, and FM contributed to implementing the research; AD and FM conducted the research and wrote the paper; AD, HF, KJP, VM, J-FH, and FM analyzed the data; and AD and FM had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

References

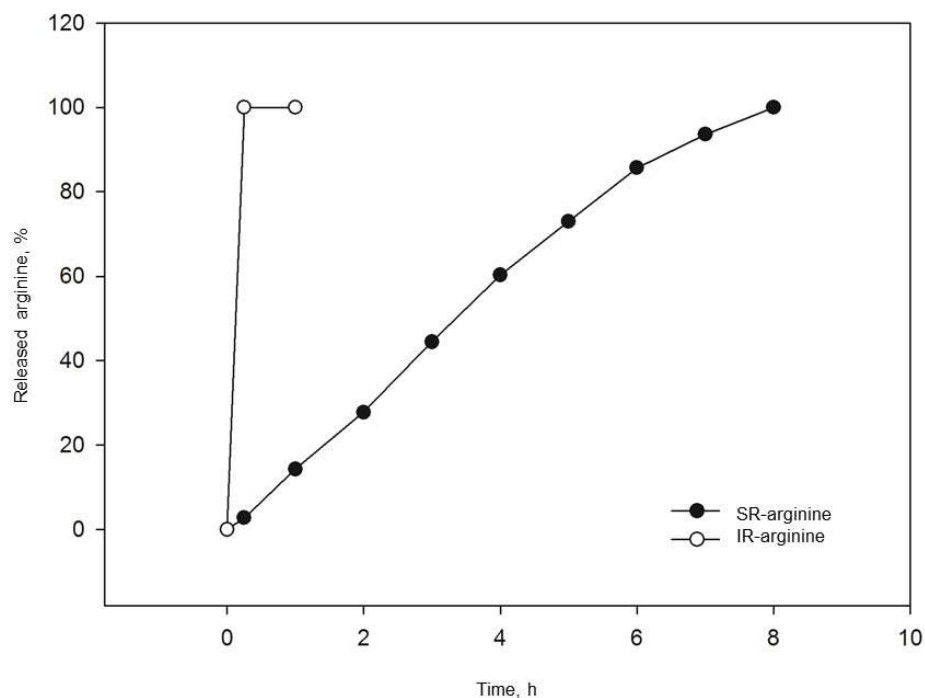
- Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006; 15:265–79.
- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S193–201.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888–904.
- Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 2003;3:279–88.
- Siervo M, Jackson SJ, Bluck LJ. In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method. *J Hypertens* 2011;29:1515–27.
- Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 2002;162:1–15.
- West SG, Likos-Krick A, Brown P, Mariotti F. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *J Nutr* 2005;135:212–7.
- Loscalzo J. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000;101:2126–9.
- Ohta F, Takagi T, Sato H, Ignarro LJ. Low-dose L-arginine administration increases microperfusion of hindlimb muscle without affecting blood pressure in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1407–11.
- Bode-Böger SM. Effect of L-arginine supplementation on NO production in man. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:91–9.
- Mariotti F, Petzke KJ, Bonnet D, Szezepanski I, Bos C, Huneau JF, Fouillet H. Kinetics of the utilization of dietary arginine for nitric oxide and urea synthesis: insight into the arginine-nitric oxide metabolic system in humans. *Am J Clin Nutr* 2013;97:972–9.
- Bai Y, Sun L, Yang T, Sun K, Chen J, Hui R. Increase in fasting vascular endothelial function after short-term oral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2009;89:77–84.
- Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2274–82.
- Maxwell AJ, Zapien MP, Pearce GL, MacCallum G, Stone PH. Randomized trial of a medical food for the dietary management of chronic, stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:37–45.

15. Siasos G, Tousoulis D, Vlachopoulos C, Antoniadis C, Stefanadi E, Ioakeimidis N, Andreou I, Zisimos K, Papavassiliou AG, Stefanadis C. Short-term treatment with L-arginine prevents the smoking-induced impairment of endothelial function and vascular elastic properties in young individuals. *Int J Cardiol* 2008;126:394–9.
16. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O, Beaufrère B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E340–8.
17. Mariotti F, Mahe S, Luengo C, Benamouzig R, Tomé D. Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen utilization by carbohydrates in humans. *Am J Clin Nutr* 2000;72:954–62.
18. Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65:51–9.
19. Fouillet H, Juillet B, Gaudichon C, Mariotti F, Tomé D, Bos C. Absorption kinetics are a key factor regulating postprandial protein metabolism in response to qualitative and quantitative variations in protein intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:R1691–705.
20. Wilson AM, Harada R, Nair N, Balasubramanian N, Cooke JP. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* 2007;116:188–95.
21. Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T, Shimamoto T. Metabolic syndrome and urinary cGMP excretion in general population. *Atherosclerosis* 2007;190:423–8.
22. Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2008;19:345–50.
23. Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, Li H, Benndorf R, Luneburg N, Förstermann U, Böger RH. Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2008;54:292–300.
24. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:97–104.
25. Siervo M, Stephan BC, Feelisch M, Bluck LJ. Measurement of in vivo nitric oxide synthesis in humans using stable isotopic methods: a systematic review. *Free Radic Biol Med* 2011;51:795–804.
26. Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000;478:1–3.
27. Kurz S, Harrison DG. Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest* 1997;99:369–70.
28. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4843–8.
29. Joshi MS, Ferguson TB, Jr., Johnson FK, Johnson RA, Parthasarathy S, Lancaster JR, Jr. Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:9982–7.
30. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1–17.
31. Wyatt AW, Steinert JR, Mann GE. Modulation of the L-arginine/nitric oxide signalling pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Soc Symp* 2004;(71):143–56.
32. Lim HK, Lim HK, Ryoo S, Benjo A, Shuleri K, Miriel V, Baraban E, Camara A, Soucy K, Nyhan D, et al. Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3317–24.
33. Morris SM, Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* 2009;157:922–30.
34. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640–5.
35. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C; National Heart Lung, and Blood Institute; American Heart Association. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e13–8.
36. Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, Tichet J, Eschwège E, Group DESIRS. The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab* 2003;29:526–32.
37. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1039–49.
38. Gomez-Huelgas R, Bernal-López MR, Villalobos A, Mancera-Romero J, Baca-Osorio AJ, Jansen S, Guisjarro R, Salgado F, Tinahones FJ, Serrano-Rios M. Hypertriglyceridemic waist: an alternative to the metabolic syndrome? Results of the IMAP Study (multidisciplinary intervention in primary care). *Int J Obes (Lond)* 2011;35:292–9.
39. Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. The hypertriglyceridemic-waist phenotype and the risk of coronary artery disease: results from the EPIC-Norfolk prospective population study. *CMAJ* 2010;182:1427–32.
40. Mariotti F, Huneau JF, Szezepanski I, Petzke KJ, Aggoun Y, Tomé D, Bonnet D. Meal amino acids with varied levels of arginine do not affect postprandial vascular endothelial function in healthy young men. *J Nutr* 2007;137:1383–9.
41. Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr* 1986;116:36–46.
42. Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL, Lemosquet S. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *J Dairy Sci* 2012;95:5876–87.
43. Tang WH, Wang Z, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2061–7.
44. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005;294:81–90.
45. Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem* 1989;61:2715–8.
46. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10480–4.
47. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 2002;18:761–6.
48. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Sweeters N, Simon J, Vichinsky EP, Styles LA. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2000;111:498–500.
49. Böger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* 2007;137(6, Suppl 2):1650S–5S.
50. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienzyk PJ, Johnston A, Benjamin N, Ritter JM. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension* 1998;32:730–4.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Figure 1

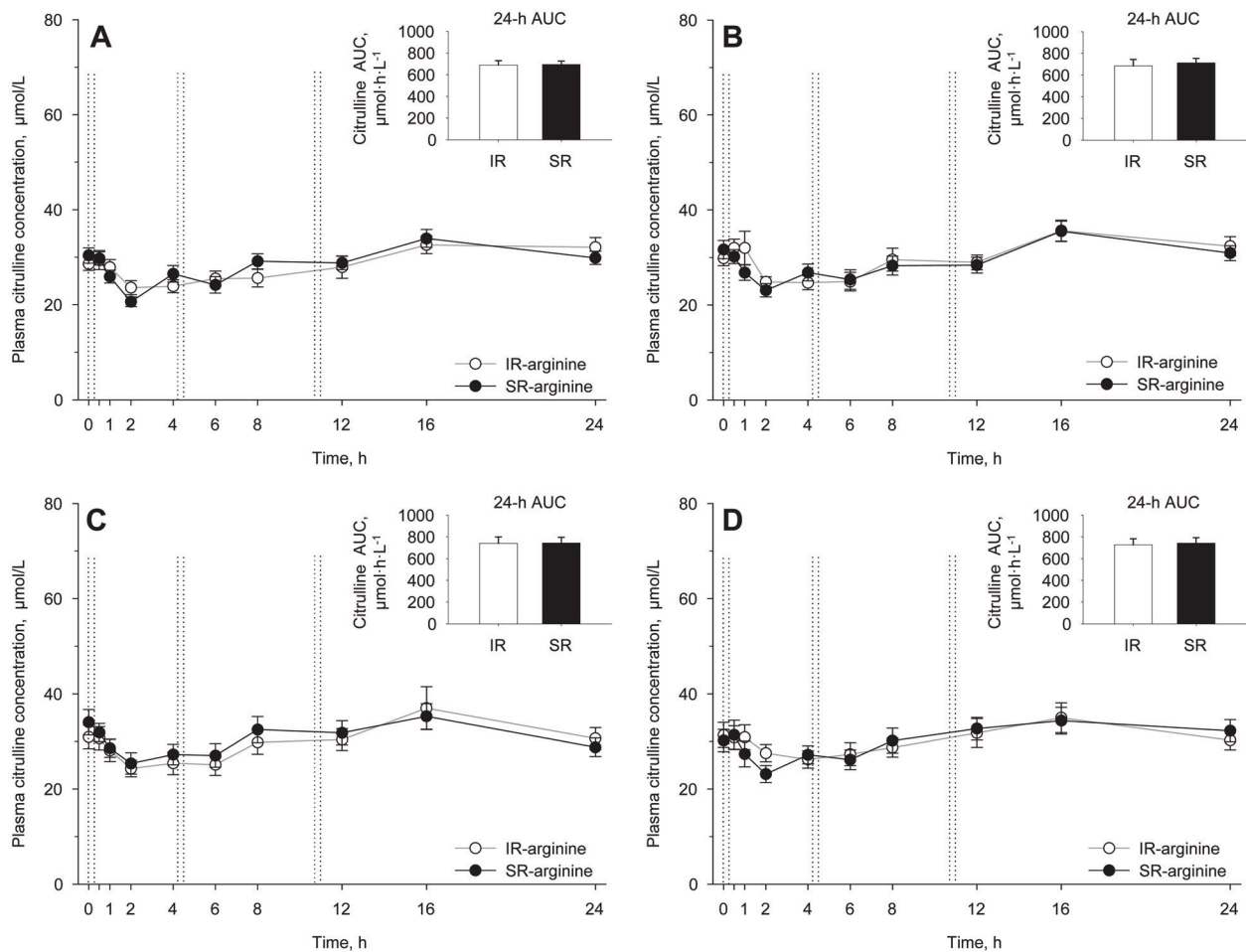
Dissolution curves of the IR and SR-arginine supplements



SUPPLEMENTAL FIGURE 1. Dissolution curves of the immediate-release and sustained-release arginine forms. Dissolution tests of two arginine forms were performed at 37 °C, in a stirred solution, at pH 1.5 for 1 h with sampling every 15 min for the IR form, and in a stirred solution with a gradual increase in pH (0-1 h: pH 1.5; 1-4 h: pH 4.5; 4-8 h: pH 7.2) for 8 hours, with sampling every hour for the SR form. Arginine concentration in the samples was assayed by HPLC. IR-arginine, immediate-release arginine; SR-arginine, sustained-release arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL Supplemental Figure 2

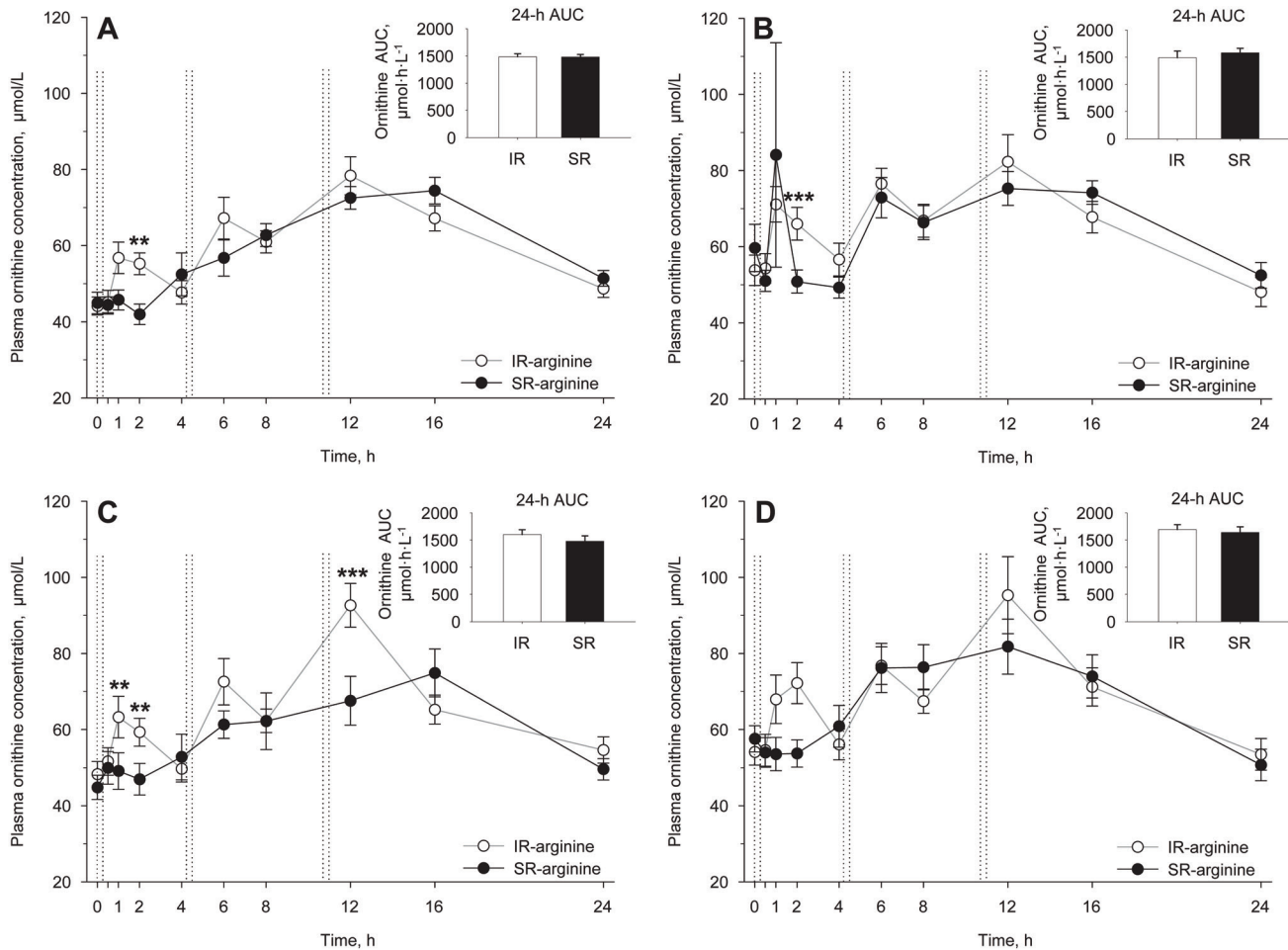
Kinetics of plasma total citrulline concentration over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 2. Kinetics of total plasma citrulline over 24 hours and AUC values in CON subjects (n=15, A and B) and the subjects with the HTW phenotype (n=12, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: treatment by time interaction, $P<0.05$; time, $P<0.0001$ and after 1 week of supplementation: treatment by time interaction, $P<0.05$; time, $P<0.0001$. Group by supplementation interaction on fasting values, $P<0.05$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL
Supplemental Figure 3

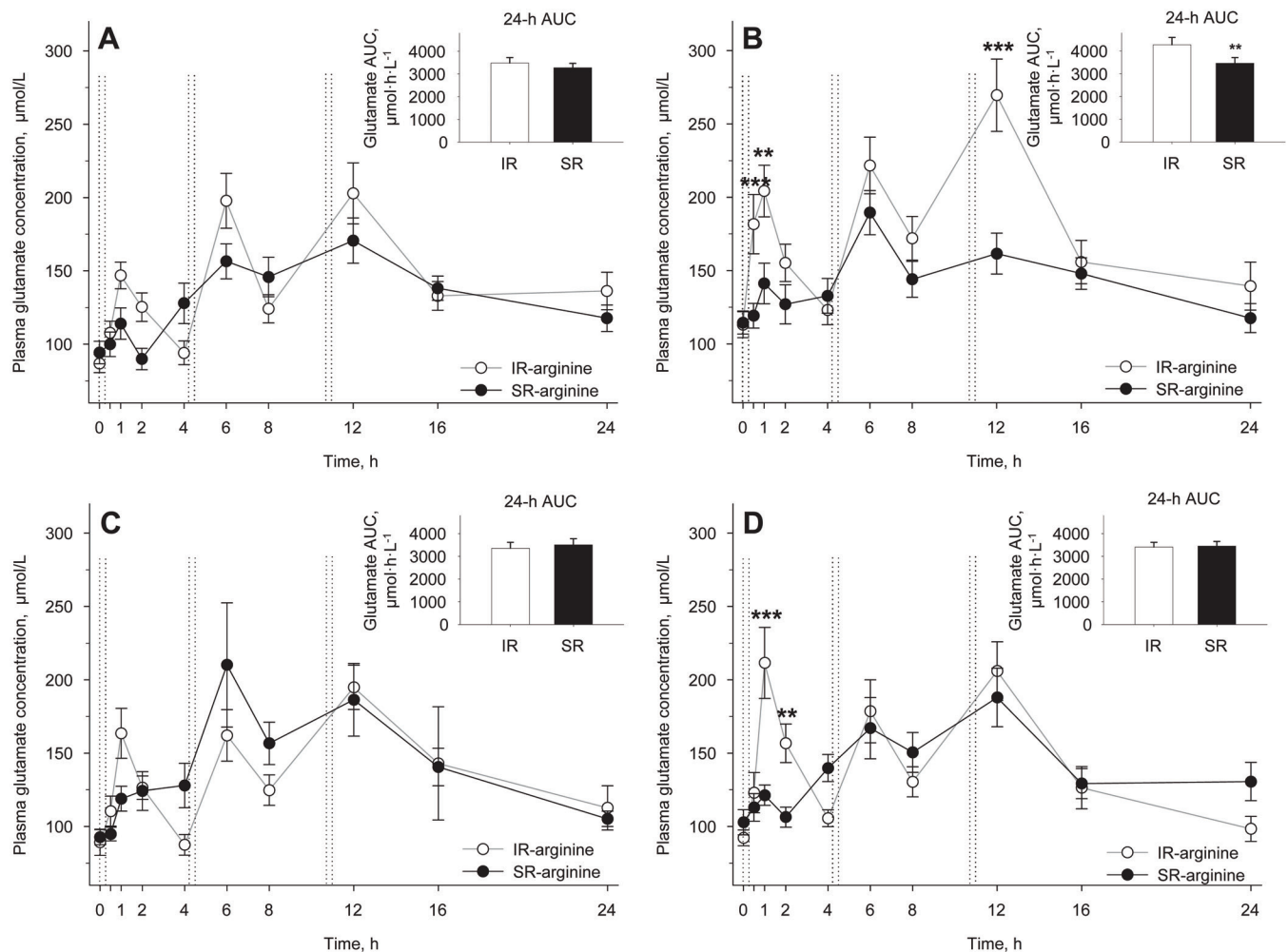
Kinetics of plasma total ornithine concentration over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 3. Kinetics of plasma total ornithine over 24 hours and AUC values in CON subjects ($n=15$, A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n=12$, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: time and treatment by time interaction, $P_s < 0.0001$ and after 1 week of supplementation: time and treatment by time interaction, $P_s < 0.0001$. Supplementation effect on AUC, $P < 0.05$. Supplementation effect on fasting values, $P < 0.001$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL
Supplemental Figure 4

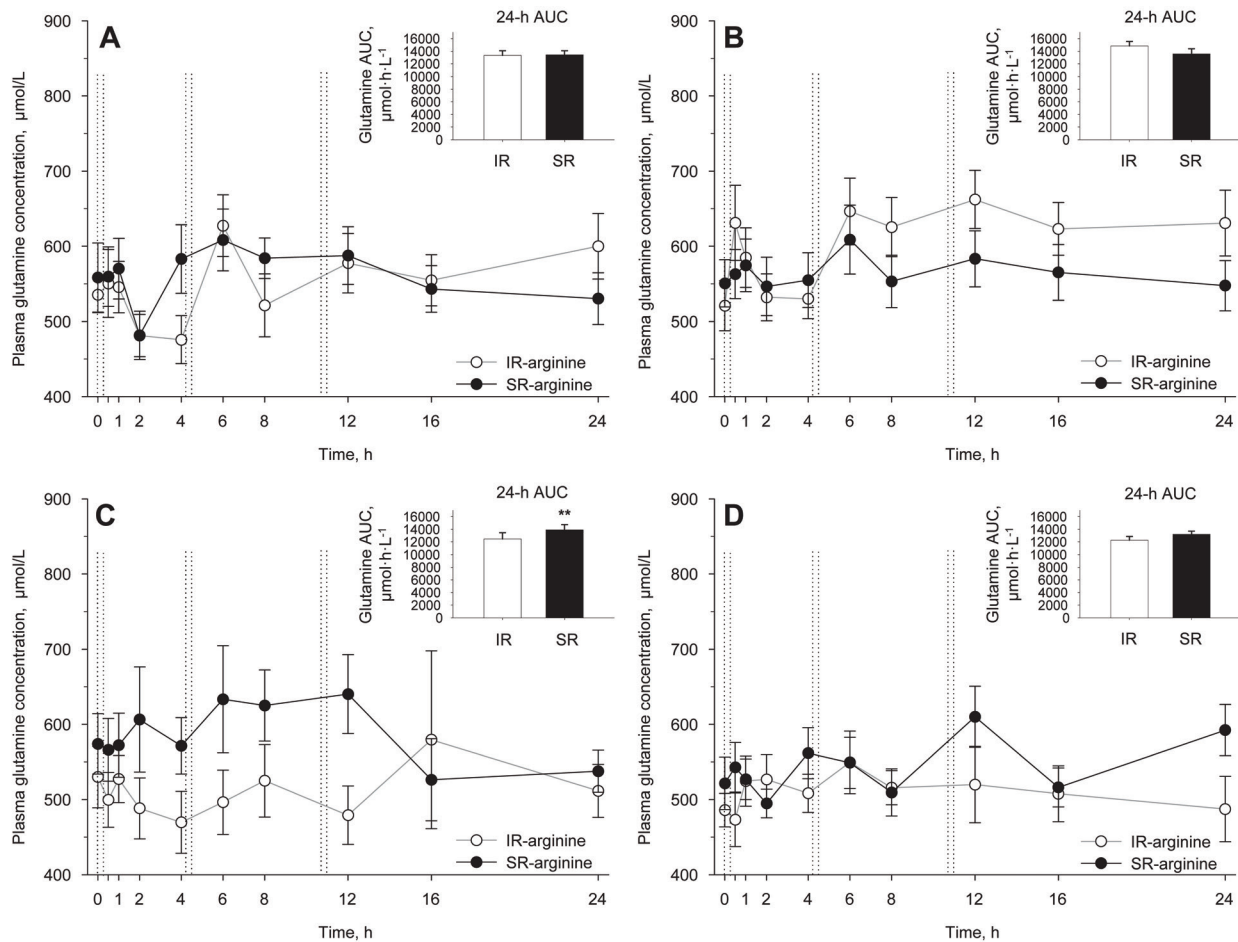
Kinetics of plasma total glutamate concentration over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 4. Kinetics of plasma total glutamate over 24 hours and AUC values in CON subjects ($n=15$, A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n=12$, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: time and treatment by time interaction, $P_s<0.0001$ and after 1 week of supplementation: treatment, $P<0.05$; group by treatment by time interaction, $P<0.001$; time and treatment by time interaction, $P_s<0.0001$. Treatment by group and treatment by period interactions on AUCs, $P_s<0.05$. Supplementation effect on fasting values, $P<0.01$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL Supplemental Figure 5

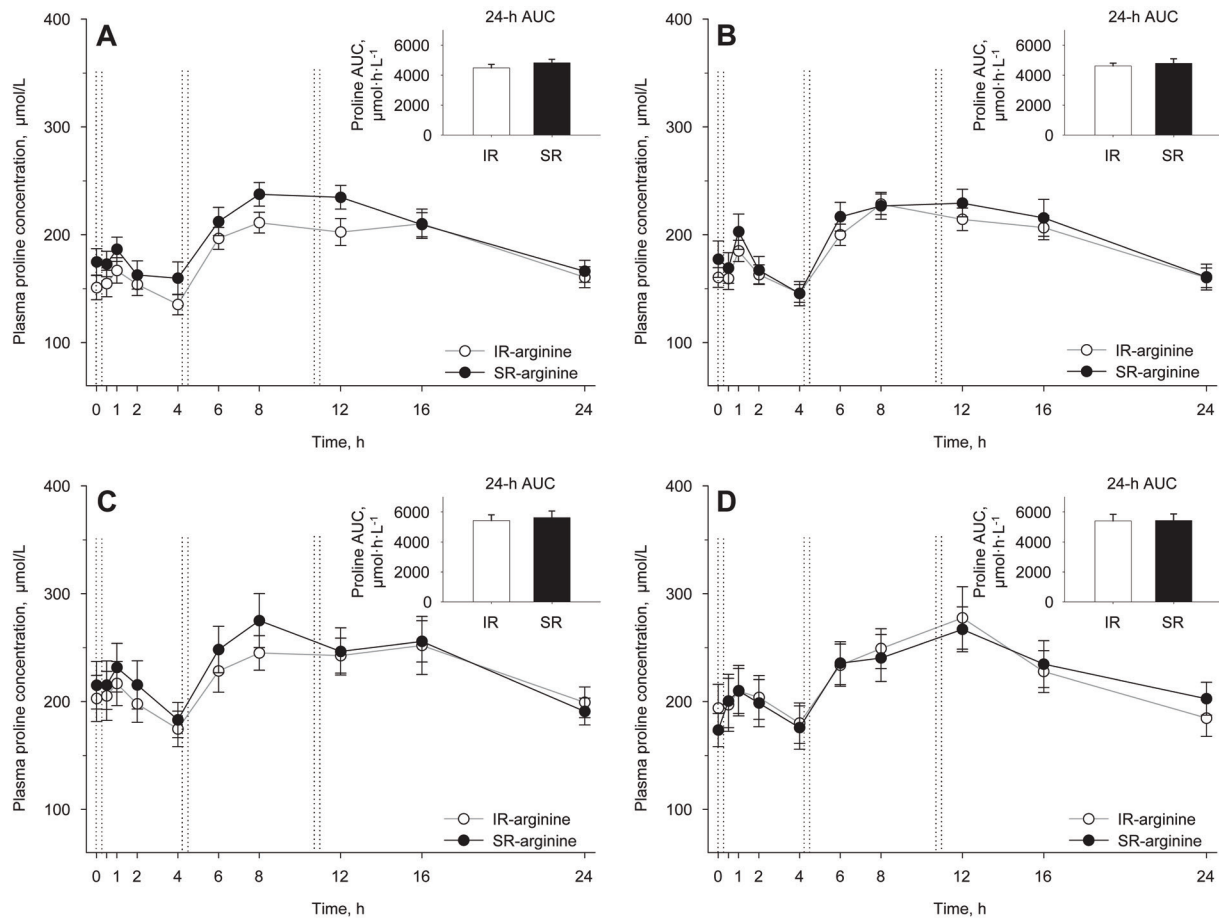
Kinetics of plasma total glutamine concentration over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 5. Kinetics of total plasma glutamine over 24 hours and AUC values in CON subjects ($n=15$, A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n=12$, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: time, $P<0.01$ and after 1 week of supplementation: group by treatment by time interaction, $P<0.05$; time, $P<0.0001$. Period effect and treatment by supplementation interaction on AUCs, $P_s<0.05$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): ** $P<0.01$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL Supplemental Figure 6

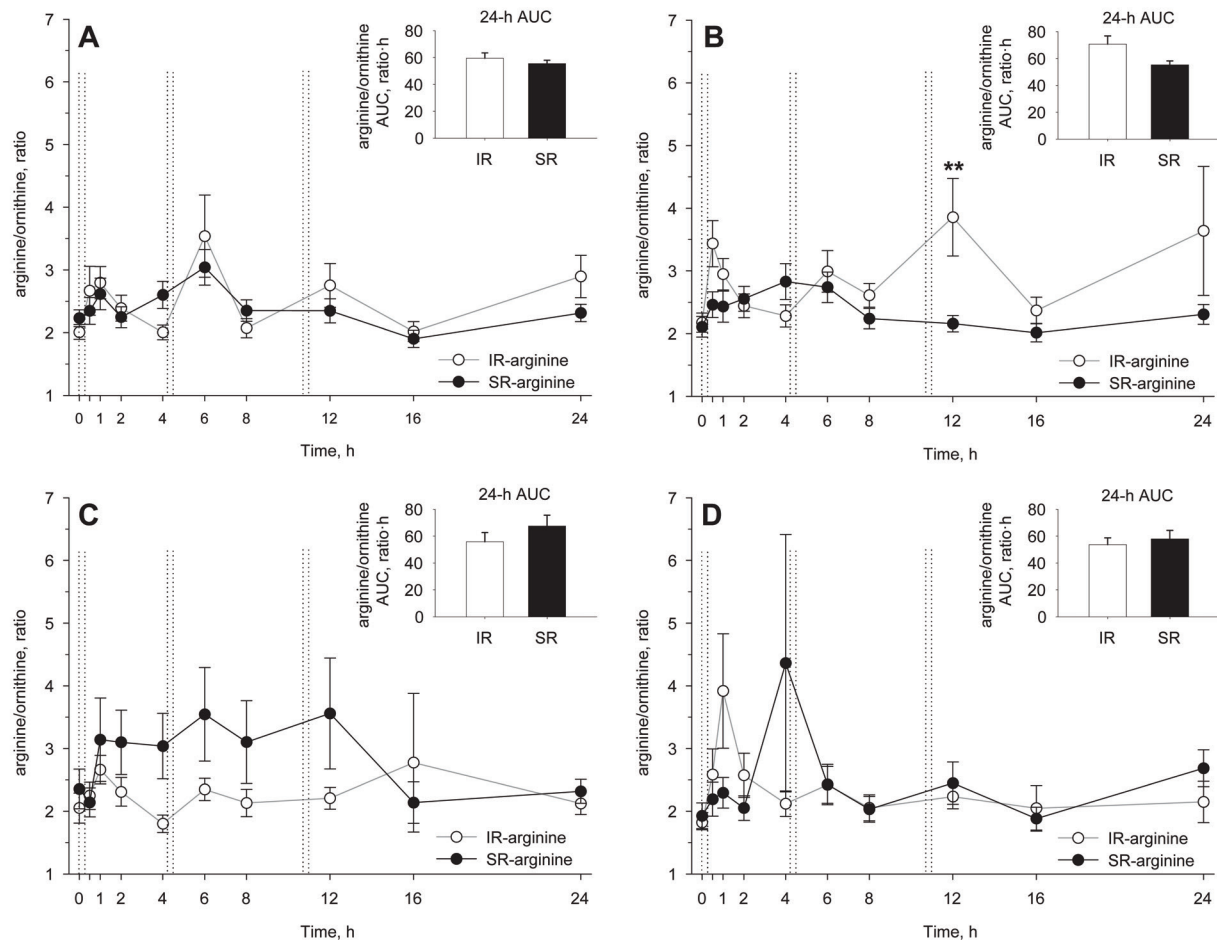
Kinetics of plasma total proline concentration over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 6. Kinetics of total plasma proline over 24 hours and AUC values in CON subjects ($n=15$, A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n=12$, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: group, $P<0.05$; time, $P<0.0001$ and after 1 week of supplementation: time, $P<0.0001$. Group effect on AUCs, $P<0.05$. Time by supplementation interaction on fasting values, $P<0.05$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL Supplemental Figure 7

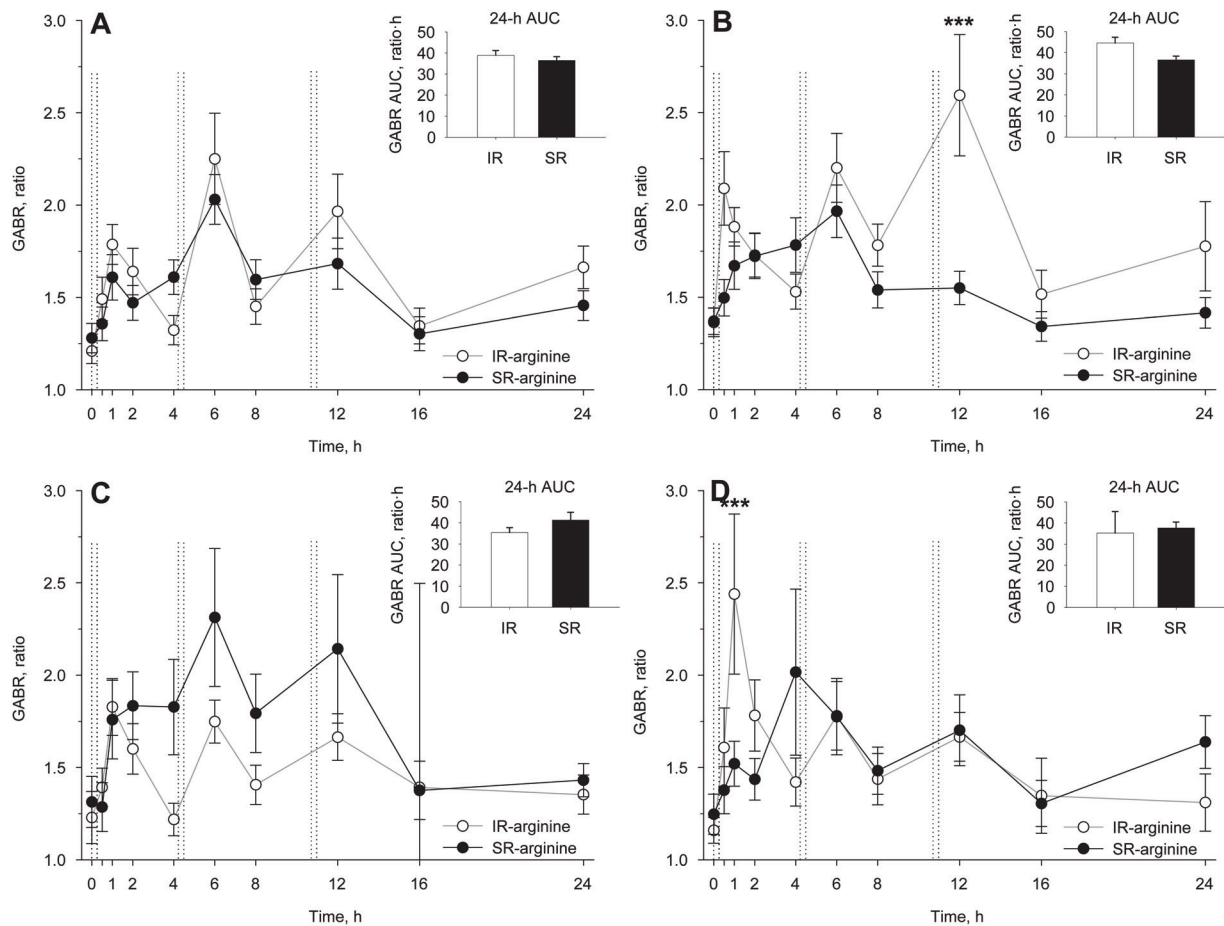
Kinetics of arginine/ornithine ratio over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 7. Kinetics of arginine/ornithine ratio over 24 hours and AUC values in CON subjects ($n=15$, A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n=12$, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: time, $P<0.0001$ and after 1 week of supplementation: treatment by time interaction, $P<0.05$; time, $P<0.01$. Treatment by group and treatment by period interactions on AUCs, $P<0.05$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): $**P<0.01$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL Supplemental Figure 8

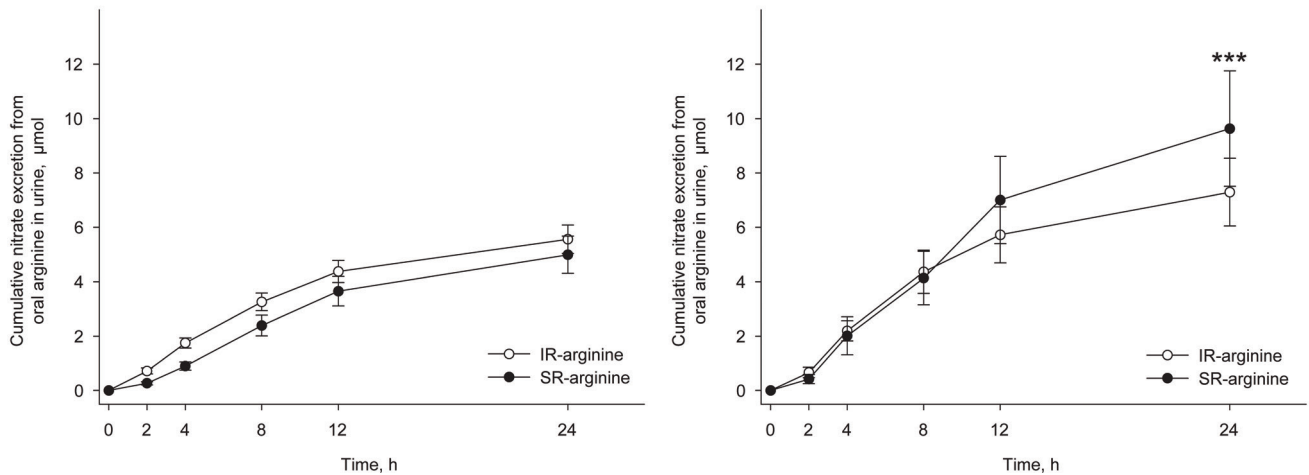
Kinetics of arginine/(ornithine+citrulline) ratio over 24 hours



SUPPLEMENTAL FIGURE 8. Kinetics of GABR (defined as arginine/[ornithine+citrulline]) over 24 hours and AUC values in CON subjects ($n=15$, A and B) and the subjects with the HTW phenotype ($n=12$, C and D), on the first day of supplementation (A and C) and the last day of a 7-day supplementation period (B and D), who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. The three series of two vertical lines indicate the three arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) on the first day of supplementation: treatment by time interaction, $P<0.05$; time, $P<0.0001$ and after 1 week of supplementation: group by treatment by time interaction, $P<0.01$; time and treatment by time interaction, $P_s<0.0001$. Treatment by group, treatment by supplementation and treatment by period interactions on AUCs, $P_s<0.05$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): *** $P<0.001$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; GABR, global arginine bioavailability ratio defined by arginine/(ornithine+citrulline); HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

**ONLINE SUPPORTING
MATERIAL Supplemental Figure 9**

Kinetics of the utilization of oral arginine for NO synthesis



SUPPLEMENTAL FIGURE 9. Cumulative urinary excretion of nitrate originating from the oral IR-arginine or SR-arginine, labeled with [15N2-(guanidino)]-arginine, after 1 week of supplementation, in CON subjects (n=15, A) and subjects with the HTW phenotype (n=12, B) who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures): the cumulative excretion curves differed between subject groups and the treatment effect on cumulative excretion described above in HTW subjects was not the same in CON subjects, group by time and group by treatment by time interactions, $P_s < 0.01$; time and treatment by time interaction, $P_s < 0.0001$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison between IR and SR-arginine after supplementation in the subjects with the HTW phenotype under the mixed model): *** $P < 0.001$. CON, control; IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-arginine, sustained release-arginine.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL
Supplemental Table 1

Energy, energy nutrient and arginine intakes during the 24-h experimental sessions

The macronutrient composition (in grams) and the energy content (in kcal) of each dish were taken from the nutrient information panel on the package and also expressed as a percentage of energy, based on 4 kcal/g for proteins and carbohydrates and 9 kcal/g for lipids. In order to calculate the amount of arginine, each dish was broken down into its ingredients using standard recipe calculations. The protein content of each ingredient was calculated from the French food composition table (Ciquel table, Ciquel) and the protein content of each dish was then estimated. The arginine content of each ingredient was calculated from the USDA Nutrient Database and the arginine content of each dish was then estimated. This estimate was corrected for a difference in protein content as calculated from the recipe vs labeled on the dish. It should be noted that the objective of this calculation was to obtain a rough estimate of the arginine intake to be compared with the mean of the rough estimates of usual arginine intake reported in the literature.

SUPPLEMENTAL TABLE 1

Energy, energy nutrient and arginine intakes at each meal during the 24-h experimental sessions for CON subjects and subjects with the HTW phenotype

Meal	Quantity g	Energy kcal	Proteins		Carbohydrates		Lipids		Arginine content g
			g	% of energy ¹	g	% of energy ¹	g	% of energy ¹	
Breakfast									
LOPROFIN chocolate wafers	50.0	275	0.100	0.200	33.0	48.0	15.9	51.9	0.00
TROPICANA Pure Premium orange juice	100	48.0	0.800	6.70	10.0	83.3	0.00	0.00	0.0500
Lunch									
FINDUS lasagna bolognese	300	360	19.5	21.7	30.0	33.3	18.0	45.0	1.01
PICARD country bread	62.5	161	5.20	12.8	33.5	83.1	0.800	4.20	0.200
PICARD apple crumble	170	380	4.00	4.20	52.2	54.9	17.3	41.0	0.140
Dinner									
FINDUS shepherd's pie	300	340	19.5	22.9	30.0	35.3	15.0	39.7	1.09
PICARD country bread	62.5	161	5.20	12.8	33.5	83.1	0.800	4.20	0.200
BONNE MAMAN madeleine	75.0	317	4.90	6.20	34.6	43.7	17.3	49.1	0.230
TOTAL	1120	2080	59.1	11.6	257	50.3	85.0	37.4	2.92

¹As calculated from the quantity of each macronutrient and the total energy, as shown in the information panel on the package. CON, control; HTW, hypertriglyceridemic waist.

References cited:

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2013. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home. Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhmrc/ndl>. ANSES/Ciquel French food composition table version 2013. Available online at <https://pro.anses.fr/tableciquel/index.htm>.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Table 2

SUPPLEMENTAL TABLE 2

Fasting plasma arginine bioavailability in CON subjects and subjects with the HTW phenotype who received IR-arginine and SR-arginine treatments, each for 1 wk¹

	First day of supplementation		Last day of supplementation		P values ²		
	CON	HTW	CON	HTW	Treatment	Group	Interaction
Arginine/ADMA							
IR-arginine	261 ± 32.1	205 ± 15.7	249 ± 25.1	245 ± 36.1	NS	NS	NS
SR-arginine	261 ± 27.6	248 ± 25.9	254 ± 21.6	281 ± 28.8			
Arginine/Ornithine							
IR-arginine	2.0 ± 0.12	2.1 ± 0.24	2.2 ± 0.15	1.8 ± 0.12	NS	NS	NS
SR-arginine	2.2 ± 0.20	2.4 ± 0.32	2.1 ± 0.16	1.9 ± 0.21			
GABR							
IR-arginine	1.2 ± 0.068	1.2 ± 0.14	1.4 ± 0.077	1.2 ± 0.070	NS	NS	NS
SR-arginine	1.3 ± 0.080	1.3 ± 0.14	1.4 ± 0.071	1.2 ± 0.11			

¹All values are means ± SEMs, n=27; ranges in parentheses. ADMA, asymmetric dimethyl-arginine; CON, control subjects; GABR, global arginine bioavailability ratio defined by arginine/(ornithine+citrulline); HTW, hypertriglyceridemic waist; IR-arginine, immediate release-arginine; NS, not significant (P≥0.05); SR-arginine, sustained release-arginine.

²P values are for the main effects of treatment and group and the group by treatment interaction as analyzed using a mixed model. None of the multiple comparisons, corrected for multiplicity with the Hochberg-Bonferroni procedure was significant.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Methods 1

Non-inclusion criteria of the study population

The non-inclusion criteria in both groups were obesity (BMI >30); cardiac or vascular diseases; diabetes; thyroid disease; systolic blood pressure >150 mmHg or diastolic blood pressure >90 mmHg; tobacco consumption >6 cigarettes per week; alcohol consumption >3 drinks per day; any medications (except contraceptive treatment) or intake of dietary supplements that could not be discontinued more than one week before the first visit and then for the entire duration of the study; persons under guardianship; pregnancy (positive beta-hCG blood test); positive Hepatitis B virus, Hepatitis C virus and HIV; hemoglobin <14 g/dL (for men) or <12 g/dL (for women); participation in a clinical trial during the 6 months prior to the study.

Recruitment of subjects

The subjects were recruited, between October 2012 and February 2013, by the Human Research Center at Avicenne Hospital (CRNH Ile-de-France Human Research Center) using standard methods: posters; word-of-mouth; mailing list; electronic posting on internet social networks. Those interested were then interviewed and details of the study were presented to them, and they were asked a series of medical and lifestyle questions. Eighty people met the study criteria and were scheduled for clinical screening by the Human Research Center. After obtaining their written informed consent, a screening blood sample was drawn. Body weight, height and waist circumference were measured, and the BMI calculated. From the 80 persons who were assessed, 32 subjects finally confirmed their willingness to participate and were found to be eligible to take part in the study (Figure 1). The study was approved by the Institutional Review Board of Saint-Germain-en-Laye Hospital and the French Ministry for Health and was conducted from March 2013 to May 2013.

Randomization scheme

At enrollment, the subjects were assigned to a pre-determined randomized sequence number. Each sequence specified an order of administration of IR-arginine and SR-arginine. The randomization scheme consisted of successive blocks such that each block contained two assignments of sequences in random order, the randomization scheme being thus balanced at the completion of each block. The randomization list was generated by the Clinical department of Pierre Fabre Médicament (Toulouse, France) using internally certified software. Using another test list, a Pierre Fabre statistician checked that the randomization scheme parameters were properly specified in the software and finally approved the randomization method. The definitive randomization list was then issued.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Method 2

Calculations of Nitric oxide synthesis and plasma arginine originating from oral arginine

The specific fraction of plasma arginine that originated from oral arginine was calculated using the standard isotopic dilution equation:

$$C_{\text{Arg}}(t) \times [E_{\text{Plasma_Arg}}(t) - E_{\text{Plasma_Arg}}(0)] \div E_{\text{Oral_Arg}}$$

where $C_{\text{Arg}}(t)$ is the total measured concentration of arginine in the plasma at time t , $E_{\text{Plasma_Arg}}(t)$ is the ^{15}N enrichment (in atom percent excess) of arginine in the plasma sampled at time t , and $E_{\text{Oral_Arg}}$ is the ^{15}N enrichment of the guanidino moiety of oral arginine. We multiplied the measured enrichment by 2, which is the ratio of the total number of nitrogen atoms in arginine to the number of nitrogen atoms that can originate from the guanidino nitrogen moiety of arginine, in order to calculate $E_{\text{Plasma_Arg}}(t)$. This calculation also takes advantage of the fact that the potential recycling of the ^{15}N -label is negligible, since it would operate through metabolic pathways that are secondary, as we have described previously (Mariotti et al., 2013).

According to the same principle, urinary nitrate that specifically originated from oral arginine was calculating using the following equation:

$$Q_{\text{NO}_3}(t) \times [E_{\text{NO}_3}(t) - E_{\text{NO}_3}(0)] \div E_{\text{Oral_Arg}}$$

where $Q_{\text{NO}_3}(t)$ is the total amount of nitrate in urine, calculated as the concentration of nitrate in the urinary sample multiplied by the volume of urine collected at time t , and $E_{\text{NO}_3}(t)$ is the ^{15}N enrichment of nitrate in urine sampled at time t .

References cited:

Mariotti F, Petzke KJ, Bonnet D, Szezepanski I, Bos C, Huneau JF, Fouillet H. Kinetics of the utilization of dietary arginine for nitric oxide and urea synthesis: insight into the arginine-nitric oxide metabolic system in humans. *Am J Clin Nutr* 2013;97(5):972-9. doi: 10.3945/ajcn.112.048025.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Method 3

The “intention-to-treat” (ITT) analysis

ITT set

One subject with the “hypertriglyceridemic waist” (HTW) phenotype was excluded from the ITT analysis because he chose to withdraw before the start of the study for family reasons. The data concerning deviations from the protocol in 4 subjects (not taking the morning dose, taking an additional dose, forgetting to urinate in the box the next morning) (Figure 1) were considered as missing data in the ITT analysis. For the two subjects with missing urinary data at 24 h, a person (HF), who was not aware of the nature of the treatment, determined the best non-linear fit model for data concerning the cumulated urinary excretion of nitrate from ingested arginine, based on the data collected before the missing 24 h (*i.e.* at 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h) and used the resulting estimated parameters to impute the missing value at 24 h. Finally, under the ITT analysis, we analyzed 31 subjects for the main outcome (*i.e.* utilization of oral arginine for NO synthesis), without any imputation (and therefore with 3 missing values) or with 2 imputations (and therefore with 1 missing value).

Utilization of oral arginine for NO synthesis in the ITT set with imputations

When analyzing the data on the ITT set with the 2 imputations, we obtained the same results as with the per protocol analysis, except regarding the overall treatment effect ($P \geq 0.05$), but the group effect and treatment by group interaction were also significant. The utilization of oral arginine for NO synthesis was higher in HTW subjects than in control (CON) subjects (group effect, $P < 0.05$), and there was also a strong group by treatment interaction ($P < 0.05$). Thus, in HTW subjects, but not in CON subjects, the utilization of oral arginine for NO synthesis was greater with SR-arginine than with IR-arginine ($P < 0.01$).

Utilization of oral arginine for NO synthesis in the ITT set without imputations

When analyzing the data on the ITT set without imputations, we obtained the same results as the per protocol analysis, except regarding the overall treatment effect ($0.05 \leq P < 0.1$), but the group effect and treatment by group interaction were also significant. The utilization of oral arginine for NO synthesis was higher in HTW subjects than in CON subjects (group effect, $P < 0.05$), and there was also a strong group by treatment interaction ($P < 0.05$). Thus, in HTW subjects, but not in CON subjects, the utilization of oral arginine for NO synthesis was greater with SR-arginine than with IR-arginine ($P < 0.01$).

ANNEXE 1

Méthodes

Mesure de la citrulline provenant de l'arginine ingérée

La citrulline ^{15}N provenant de l'arginine ingérée a été mesurée par GC-IRMS comme décrit récemment (243). La fraction spécifique de la citrulline plasmatique provenant de l'arginine ingérée a été calculée en utilisant une équation standard de dilution isotopique :

$$C_{\text{Cit}}(t) \times [E_{\text{Plasma_Cit}}(t) - E_{\text{Cit}}(0)] \div E_{\text{Oral-Arg}}$$

où $C_{\text{Cit}}(t)$ est la concentration totale en citrulline mesurée dans le plasma au temps t , $E_{\text{Plasma-Cit}}(t)$ est l'enrichissement en ^{15}N (en atome pourcent) de l'arginine dans le plasma échantillonné au temps t , et $E_{\text{Oral_Arg}}$ est l'enrichissement en ^{15}N du groupement guanidium de l'arginine ingérée. Nous avons multiplié l'enrichissement mesuré par 3, qui est le ratio du nombre total d'atomes d'azote de la citrulline sur le nombre d'atomes d'azote qui peuvent provenir du groupement guanidium de l'arginine, afin de calculer $E_{\text{Plasma_Cit}}(t)$. Ce calcul prend en compte le fait que le recyclage potentiel du ^{15}N est négligeable puisqu'il se produirait dans des voies métaboliques secondaires, comme notre équipe l'a décrit précédemment (243).

Mesure de l'urée provenant de l'arginine ingérée

Selon le même principe, l'urée a été isolée à partir d'échantillons d'urine et de plasma, et son enrichissement en ^{15}N a été déterminée par EA-IRMS, comme décrit précédemment (33). Les fractions d'urée plasmatique et urinaire provenant spécifiquement de l'arginine ingérée ont été calculées à l'aide des équations suivantes :

$$C_{\text{Urée}}(t) \times [E_{\text{Plasma_Urée}}(t) - E_{\text{Urée}}(0)] \div E_{\text{Oral-Arg}}$$

$$Q_{\text{Urée}}(t) \times [E_{\text{Urée}}(t) - E_{\text{Urée}}(0)] \div E_{\text{Oral_Arg}}$$

où $C_{\text{Urée}}(t)$ est la concentration totale en urée mesurée dans le plasma au temps t , $E_{\text{Plasma-Urée}}(t)$ est l'enrichissement en ^{15}N (en atome pourcent) de l'urée dans le plasma échantillonné au temps t , $Q_{\text{Urée}}(t)$ est la quantité totale d'urée dans l'urine, calculée comme la concentration d'urée dans l'échantillon urinaire multipliée par le volume d'urine collecté au temps t , et $E_{\text{Urée}}(t)$ est l'enrichissement en ^{15}N de l'urée dans l'urine échantillonnée au temps t .

Résultats

Cinétique de la synthèse de citrulline à partir de l'arginine ingérée

Les cinétiques de la citrulline plasmatique provenant de l'arginine ingérée présentaient des profils différents après la consommation de l'arginine-LP par rapport à l'arginine-LI (interaction temps x traitement, $P < 0.0001$), et différaient entre les sujets sains témoins et les sujets sains TTH (effet groupe, $P < 0.05$) (Figure 1).

Il y a eu un effet global du traitement ($P < 0.05$) et du groupe ($P < 0.05$) sur les aires sous courbes (AUC). Ainsi, l'AUC était plus importante après la supplémentation avec la forme LP qu'avec la forme LI (0.84 ± 0.28 et 0.70 ± 0.27 $\mu\text{mol.h/L}$, respectivement) et plus importante chez les sujets sains témoins que les sujets sains TTH (0.85 ± 0.27 et 0.66 ± 0.26 $\mu\text{mol.h/L}$, respectivement). Chez les sujets TTH, selon la comparaison pré-planifiée entre la forme LI et LP chez les sujets TTH, l'AUC était plus importante avec la forme LP que la forme LI ($P < 0.05$) (Figure 1).

Dans la mesure où l'apparition de la citrulline plasmatique, provenant directement de l'arginine ingérée peut être considérée comme un indicateur de l'utilisation de l'arginine orale pour la synthèse de NO, le fait que l'AUC était plus élevée avec l'arginine-LP (par rapport à l'arginine-LI) chez les sujets TTH est en accord avec les résultats obtenus pour l'apparition des nitrates urinaires à partir de l'arginine ingérée (c-à-d. une utilisation plus importante pour la synthèse de NO de l'arginine-LP, par rapport à l'arginine-LI).

Figure 1 : Cinétiques de synthèse de la citrulline provenant de l'arginine ingérée

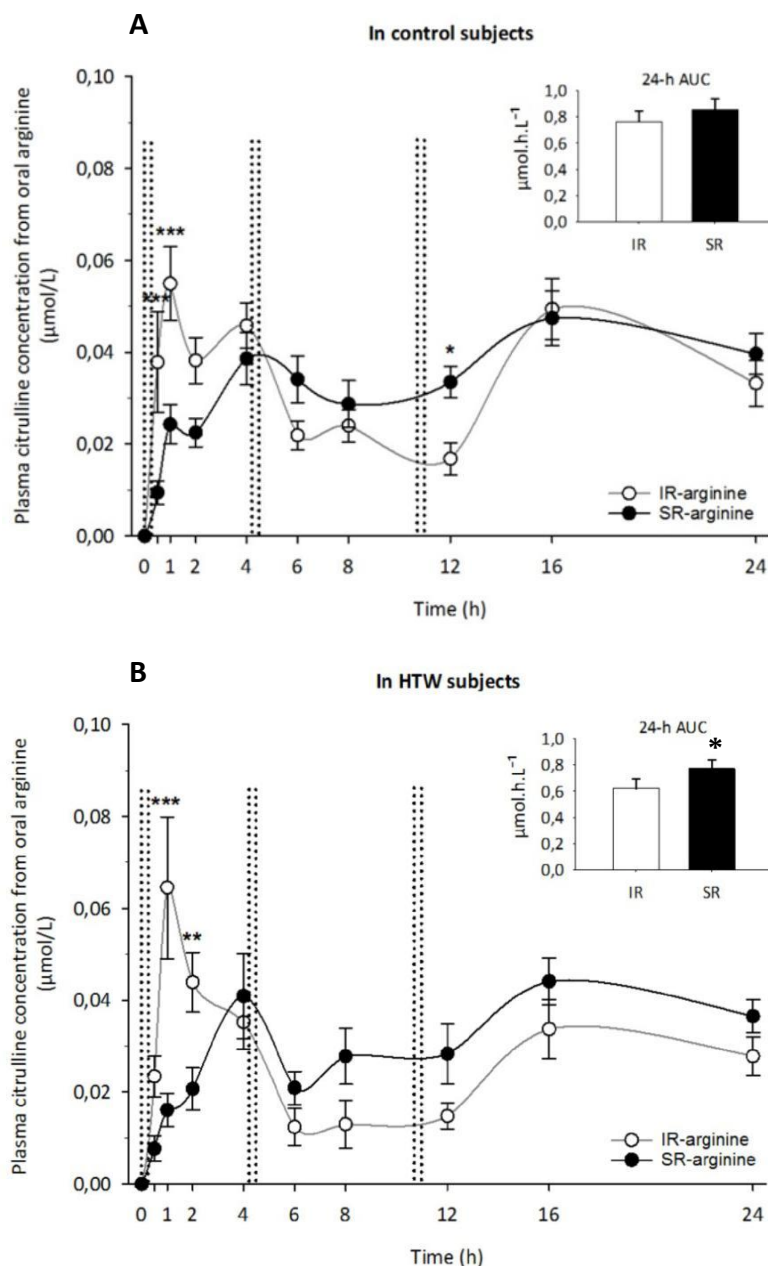


FIGURE 1. Kinetics of plasma citrulline originating from oral arginine, labeled with [¹⁵N₂-(guanidino)]-arginine, and AUC values in control ($n=15$, A) and HTW ($n=12$, B) subjects, after one week of supplementation with IR-arginine or SR-arginine. The three series of two vertical lines indicate successive arginine intakes and the start of the 3 meals, 10 minutes later. Only the first dose of arginine ingested in the morning was labeled as this is indicated by the arrow. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures): group, $P<0.05$; time and treatment by time interaction, $P<0.0001$; treatment and group effect on AUCs, $P<0.05$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison of IR and SR-arginine after supplementation in HTW subjects under the mixed model): * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, subjects with the hypertriglyceridemic waist phenotype; SR-arginine, sustained release-arginine.

Cinétiques de la synthèse d'urée provenant de l'arginine ingérée

Nous avons montré que l'augmentation en urée corporelle, qui provient de l'hydrolyse de l'arginine ingérée, avait lieu à un stade précoce et qu'elle atteignait sa valeur maximum 2 h après l'ingestion de la forme LI alors qu'elle avait lieu plus tardivement et qu'elle atteignait sa valeur maximum 6 h après l'ingestion de la forme LP (effet temps, $P<0.0001$ et interaction temps x traitement, $P<0.0001$). (Figure 2A and 2B). Les niveaux d'urée corporelle provenant de l'arginine ingérée sont plus élevés avec l'arginine-LI qu'avec l'arginine-LP (effet traitement, $P<0.0001$), plus élevés chez les sujets TTH que les sujets témoins (effet groupe, $P<0.05$).

L'excrétion urinaire cumulée de l'urée provenant spécifiquement de l'arginine ingérée (Figure 2C and 2D) est plus élevée avec l'arginine LI qu'avec l'arginine-LP (effet traitement, $P<0.0001$).

Enfin, la synthèse apparente d'urée à partir de l'arginine ingérée (Figure 2E and 2F) était plus importante avec l'arginine-LI que l'arginine-LP (effet traitement, $P<0.0001$). Nous avons observé que la conversion corps entier de l'arginine ingérée en urée a lieu à un stade précoce (effet temps, $P<0.0001$). A 24 heures, la synthèse apparente d'urée à partir de l'arginine ingérée est plus importante avec la forme LI que LP (4.7 ± 1.4 mmol et 4.3 ± 1.4 mmol respectivement, $P<0.05$).

Pour les deux formes d'arginine, environ la moitié de l'arginine ingérée est hydrolysée en urée à 8 heures, au cours de l'extraction splanchnique de premier passage. La fraction de l'arginine orale qui a été convertie en urée était d'environ 60% avec l'arginine-LI, ce qui coïncide avec les résultats antérieurs obtenus par notre équipe (243).

Figure 2 : Cinétiques de synthèse de l'urée provenant de l'arginine ingérée

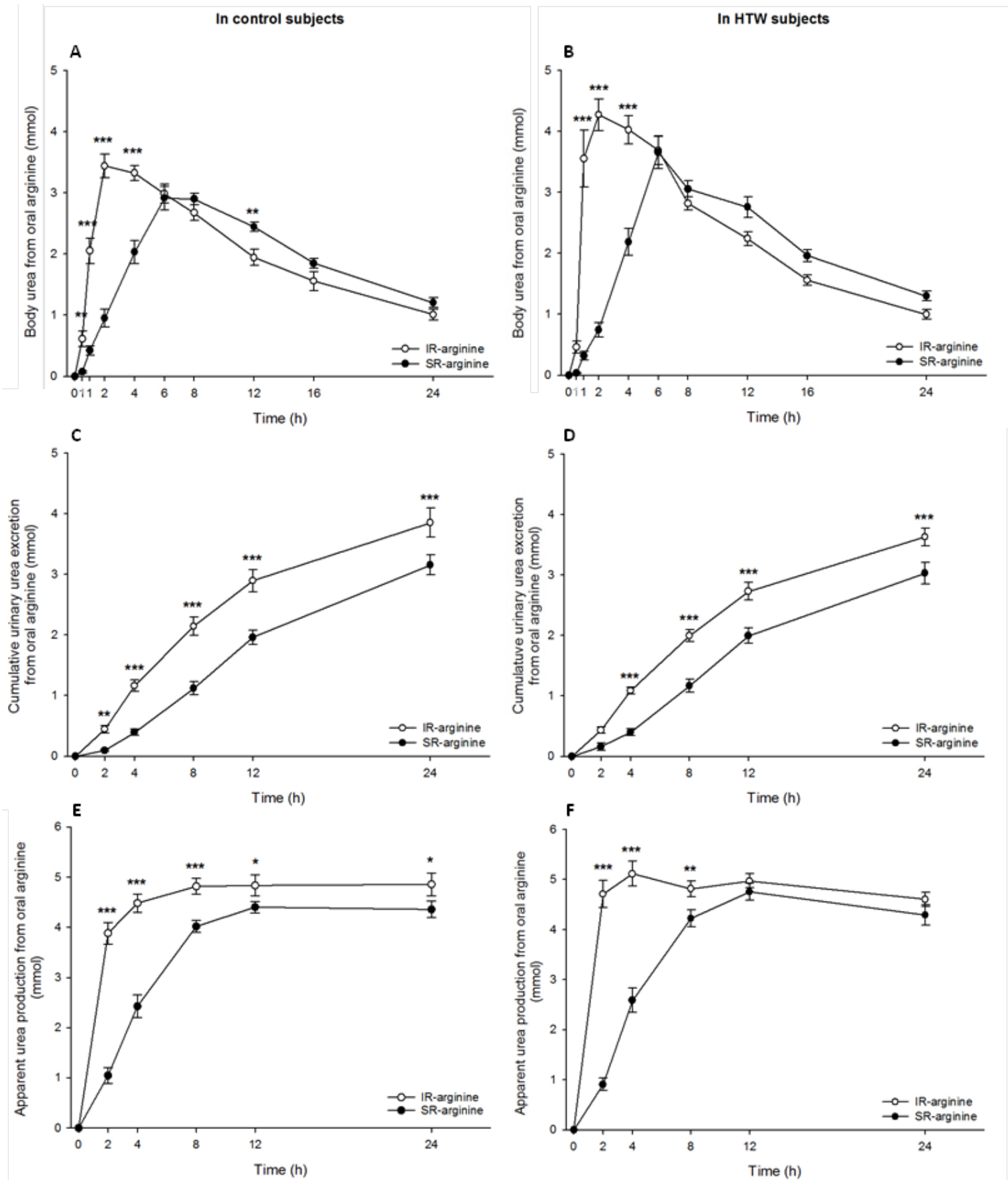


FIGURE 2. Kinetics of body urea (A and B), cumulative urinary urea excretion (C and D) and apparent urea production from oral arginine, labeled with [$^{15}\text{N}_2$ -(guanidino)]-arginine, in control ($n=15$, A, C and E) and HTW ($n=12$, B, D and F) subjects, after one week of supplementation with IR-arginine or SR-arginine. Data are means $\pm$ SEMs. Significance (mixed model for repeated measures) for body urea: group and group by treatment interaction, $P_s < 0.05$; group by time interaction, $P < 0.01$; time, treatment, and treatment by time and group by treatment by time interactions, $P_s < 0.0001$; For cumulative urinary urea excretion: time, treatment, and treatment by time interaction, $P_s < 0.0001$; For apparent urea production: group by treatment by time interaction, $P < 0.01$; time, treatment, and treatment by time interaction, $P_s < 0.0001$. Asterisks indicate differences between IR-arginine and SR-arginine (ad hoc contrasts with Hochberg-Bonferroni correction and a preplanned contrast for the comparison of IR and SR-arginine after supplementation in HTW subjects under the mixed model): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. IR-arginine, immediate release-arginine; HTW, subjects with the hypertriglyceridemic waist phenotype; SR-arginine, sustained release-arginine.

C. Etude 2 : La supplémentation en L-arginine atténue la dysfonction endothéliale postprandiale lorsque l'argininémie basale est faible chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique

Contexte et Objectif : La dysfonction endothéliale vasculaire est le processus majeur initiant l'athérosclérose. Elle apparaît transitoirement en phase postprandiale après un repas gras et sucré, et elle est d'autant plus marquée que les sujets sont à risque cardiométabolique. La dysfonction endothéliale est étroitement liée à l'altération de la synthèse et biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), dont l'arginine est le précurseur. Enfin, plusieurs études ont suggéré qu'une déficience relative en arginine circulante est présente chez les sujets atteints de maladies cardiovasculaires ou présentant des facteurs de risque cardiovasculaire. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet d'une supplémentation à faible dose (nutritionnelle) en arginine à libération prolongée (arginine-LP, mimant la mise à disposition naturelle de l'arginine alimentaire) sur la fonction endothéliale à jeun et la dysfonction endothéliale postprandiale de sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Nous avons également cherché à déterminer si cet effet pourrait varier selon l'argininémie basale des sujets.

Méthodes : Dans une étude selon un protocole croisé contre placebo, avec répartition au hasard, en double insu, nous avons comparé les effets d'une supplémentation d'arginine-LP (1,5 g, 3 fois par jour pendant 4 semaines) sur la fonction endothéliale à jeun et après un repas gras et sucré chez 33 sujets sains présentant un « tour de taille hypertriglycéridémique ». La fonction endothéliale a été évaluée par la mesure en situation post-ischémique de la dilatation de l'artère brachiale (flow-mediated dilation, FMD) et de l'augmentation du volume digital (Framingham Reactive Hyperemia Index (fRHI) selon la technique EndoPAT) (Figure 54). Les effets sur les paramètres hémodynamiques, mécaniques, métaboliques et inflammatoires ont aussi été évalués. Enfin, par une analyse en sous-groupes, nous avons déterminé si les effets étaient liés à l'argininémie basale.

Résultats et Discussion : Dans la population totale, les effets de la supplémentation en arginine-LP n'étaient pas entièrement concluants. La supplémentation en arginine-LP a atténué la dysfonction endothéliale postprandiale, mais cet effet n'a pas été confirmé par une

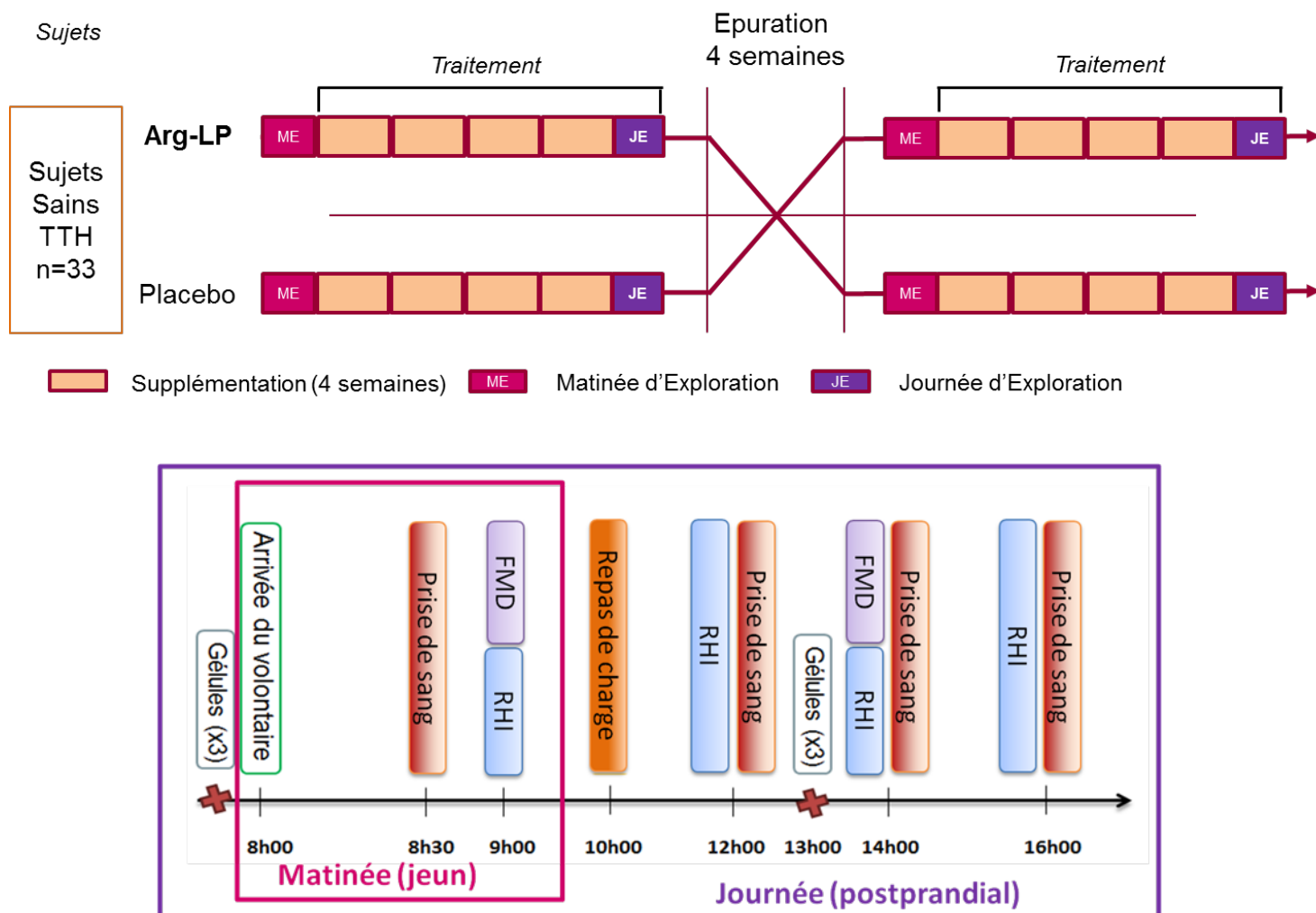


Figure 54 : Schémas du protocole de l'étude n°2 et du déroulement des journées d'exploration avant et après supplémentation

L'étude n°2 était une étude croisée, randomisée, contrôlée par placebo et en double insu. Elle a été réalisée chez 33 sujets sains présentant un tour de taille hypertriglycéridémique (TTH). Chaque sujet a reçu 4,5 g (1,5 g 3 fois par jour) d'arginine à libération prolongée (Arg-LP) et de placebo, pendant 7 jours. Lors des matinées d'exploration, un prélèvement basal de sang a été réalisé et une mesure simultanée de la fonction endothéliale par FMD et RHI a été effectuée à jeun. Lors des journées d'exploration, les prises de sang ont été effectuées à jeun et 2, 4, et 6 h après administration du repas de charge (900 Kcal). Une mesure simultanée de la fonction endothéliale par FMD et RHI a été effectuée à jeun, 1h avant le repas de charge, puis des mesures de fonction endothéliale par RHI ont été effectuées 2, 4 et 6 h après administration du repas de charge. La mesure réalisée à 4h était couplée à une mesure de FMD de la même manière qu'à jeun. L'horaire du repas de charge a été fixé à 10h. Lors du dernier jour de supplémentation du volontaire, la première prise (d'arginine ou de placebo) a eu lieu entre 7h et 8h et la deuxième prise a été fixée à 13h30.

valeur significativement plus élevée de la FMD à la fin de la période postprandiale. Il existe donc la possibilité qu'un tel effet de l'arginine-LP sur la diminution postprandiale de la FMD puisse être lié à la valeur plus élevée de la FMD à jeun avec le placebo. Le fait que la FMD ait augmenté avec le placebo et non avec l'arginine-LP était cependant inattendu. En fait, les effets de la supplémentation variaient selon l'argininémie basale ($P_s < 0,05$). Dans la moitié de la population présentant une argininémie basale relativement plus faible ($<$ médiane : 78,2 $\mu\text{mol/L}$), l'arginine-LP a atténué la diminution postprandiale de la fonction endothéliale (FMD : chute de 50% sous placebo vs 29% sous arginine-LP; fRHI : chute de 49% sous placebo et augmentation de 5% sous arginine-LP, $P_s < 0,05$), et a conduit à une fonction endothéliale significativement meilleure à la fin de la période postprandiale. La raison pour laquelle la supplémentation en arginine a des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale postprandiale lorsque les sujets sains ont une faible argininémie basale reste spéculative. Une raison possible pourrait être que chez ces sujets, l'arginine orale compenserait la plus faible biodisponibilité basale de l'arginine endogène pour la synthèse de NO, et cet effet serait apparent et efficace lors d'une situation où la synthèse de NO est altérée, comme lors de la phase postprandiale.

Conclusion : Une supplémentation en arginine de type nutritionnelle (c.-à-d. à faible dose et libération lente) atténue la dysfonction endothéliale postprandiale lorsque l'argininémie basale est faible. Nous proposons que l'intérêt d'une supplémentation en arginine consiste en sa capacité à pallier une configuration du métabolisme de l'arginine qui soit moins apte à assurer la biodisponibilité de l'arginine pour la synthèse de NO lors d'une dysfonction endothéliale aiguë, et que cette configuration se traduise et se détecte par une argininémie basale relativement plus faible.

1. Eléments de choix méthodologiques.

1.2. Choix du repas de charge

Notre principal objectif en élaborant le repas de charge hyperlipidique était de disposer d'un repas suffisamment délétère qui nous permettrait d'induire la dysfonction endothéliale aiguë attendue tout en gardant une vraisemblance nutritionnelle. Au regard de la littérature, il nous est apparu évident que la richesse en acides gras saturés du repas nous donnait la garantie d'induire des effets délétères postprandiaux. C'est pour cela que nous avons choisi un repas de charge hyperlipidique contenant 80% de l'énergie sous forme de crème. La présence de glucides (13%) et de protéines (7%) a donné un caractère mixte à notre repas (372). De plus, les 13% de glucides contenus dans le repas hyperlipidique étaient du saccharose, dont l'effet potentialisateur sur le métabolisme lipidique a été démontré. A ce titre, on peut considérer que notre repas de charge, à la fois riche en acides gras saturés et en saccharose, était doublement délétère. Par ailleurs, il est intéressant de noter que notre repas de charge reste un repas de charge classique utilisé comme test de provocation métabolique chez l'Homme (800-1200 kcal) puisqu'il correspondait à un apport énergétique de 900 kcal (179, 372).

Le choix du repas de charge a été validé à posteriori par la caractérisation de l'excursion lipémique et glucidique et nous avons évalué l'apparition de signes d'une inflammation à bas bruit pendant la période postprandiale en effectuant une numération leucocytaire. Enfin, nous avons évalué la dysfonction endothéliale induite par le repas de charge, d'une part, à l'aide de la mesure de marqueurs circulants de l'activation endothéliale (ICAM-1, VCAM-1, PAI-1,...) et d'autre part, par la mesure de l'altération postprandiale de la réactivité vasculaire (notamment par la mesure de la FMD).

1.3. Evaluation physiologique de la fonction endothéliale à jeun et en postprandial

Nous avons choisi d'utiliser deux techniques d'exploration physiologique de la fonction endothéliale reposant toutes les deux sur une évaluation non-invasive, de la réactivité vasculaire post-ischémique, endothélium-dépendante : la mesure de l'augmentation du diamètre de l'artère brachiale par échographie doppler (mesure de la FMD) et la mesure de l'augmentation du volume digital par pléthysmographie (mesure du RHI), toutes les deux induites par l'hyperémie provoquée par la décompression rapide d'un brassard de pression suprasystolique (344, 349, 373-375). Ces techniques sont des techniques d'usage assez

courant (la FMD est la méthode la plus validée et la plus largement utilisée), bien décrites (345), non-invasives et n'engendrant comme effet indésirable qu'un inconfort temporaire lors de la compression du brassard suprasystolique. La technique FMD a été utilisée lors de l'examen à jeun et en postprandial, 4 h après l'administration du repas de charge. En complément de la mesure de FMD, comme mesure contrôle, nous avons réalisé une mesure de la réactivité de l'artère brachiale endothélium-indépendante. En effet, la FMD rend compte à la fois de la fonction endothéliale (la synthèse de NO en réponse au flux sanguin) et de la réactivité du muscle lisse (relaxation en réponse au NO). Une absence de différence de dilatation en réponse à l'administration d'un donneur nitrergique agoniste direct du muscle lisse permet de s'assurer que la FMD rend bien compte spécifiquement de la fonction endothéliale (345). Nous avons choisi pour cela d'analyser la réaction vasculaire de l'artère brachiale, après l'administration de trinitrine, qui est un vasodilatateur/donneur de NO couramment utilisé en étude clinique et qui agit directement sur la relaxation de la fibre musculaire lisse. En parallèle, nous avons choisi d'effectuer des mesures de RHI en raison de son avantage majeur qui réside dans sa reproductibilité et la facilité de la mesure automatisée. L'utilisation de cette technique nous a permis de réaliser un plus grand nombre de mesures. Plus précisément, nous avons mesuré le Framingham-RHI (fRHI) qui est un RHI alternatif proposé par l'étude Framingham et qui est mieux corrélé aux marqueurs de risque des maladies cardiovasculaires (349, 354). Nous avons effectué les mesures de fRHI à jeun, puis 2 h, 4 h, et 6 h après l'administration du repas de charge, dans le cas des journées d'exploration après supplémentation. Pour ce qui est des mesures à jeun et à 4 h, nous avons couplé la mesure de FMD avec celle du fRHI. Enfin, par ailleurs, pour contrôle, nous avons procédé à une analyse de la géométrie de l'onde de pouls (par analyse pléthysmographique digitale) pour évaluer les propriétés mécaniques artérielles générales (dont l'indice d'augmentation), le matin à jeun de chaque journée d'exploration.

En complément, nous avons choisi de doser les marqueurs plasmatiques indirects de la fonction endothéliale (ICAM-1, VCAM, Sélectine-E, Sélectine-P, ET-1, PAI-1 et CRP) et de l'inflammation (par ex. leucocytes, neutrophiles et monocytes).

2. Article 2

L-arginine supplementation alleviates postprandial endothelial dysfunction when baseline fasting plasma arginine concentration is low: a randomized controlled trial in healthy subjects with cardiometabolic risk factors.

Ambre Deveaux, Isabelle Pham, Sheila G West, Etienne André, Frédérique Lantoiné-Adam, Pierre Bunouf, Samira Sadi, Dominique Hermier, Véronique Mathé, Hélène Fouillet, Jean-François Huneau, Robert Benamouzig, and François Mariotti.

J Nutr. 2016 Jun 8. pii: jn227959. [Epub ahead of print].

L-Arginine Supplementation Alleviates Postprandial Endothelial Dysfunction When Baseline Fasting Plasma Arginine Concentration Is Low: A Randomized Controlled Trial in Healthy Overweight Adults with Cardiometabolic Risk Factors^{1–3}

Ambre Deveaux,⁴ Isabelle Pham,⁵ Sheila G West,⁶ Etienne André,⁷ Frédérique Lantoin-Adam,⁷ Pierre Bunouf,⁷ Samira Sadi,⁴ Dominique Hermier,⁴ Véronique Mathé,⁴ Hélène Fouillet,⁴ Jean-François Huneau,⁴ Robert Benamouzig,⁴ and François Mariotti^{4*}

⁴UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, France;

⁵Department of Physiology and Functional Investigations, Jean Verdier Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux Paris, Bondy, France;

⁶Departments of Nutritional Sciences and Biobehavioral Health, Pennsylvania State University, University Park, PA; and ⁷Institut de Recherche Pierre Fabre, Boulogne-Billancourt, France

Abstract

Background: Vascular endothelial dysfunction, the hallmark of early atherosclerosis, is induced transiently by a high-fat meal. High doses of free L-arginine supplements reduce fasting endothelial dysfunction.

Objective: We sought to determine the effects of a low dose of a sustained-release (SR) L-arginine supplement on postprandial endothelial function in healthy overweight adults with cardiometabolic risk factors and to investigate whether this effect may vary by baseline arginine status.

Methods: In a randomized, double-blind, 2-period crossover, placebo-controlled trial (4-wk treatment, 4-wk washout), we compared the effects of 1.5 g SR-L-arginine 3 times/d (4.5 g/d) with placebo in 33 healthy overweight adults [body mass index (BMI, in kg/m²): 25 to >30] with the hypertriglyceridemic waist (HTW) phenotype [plasma triglycerides > 150 mg/dL; waist circumference > 94 cm (men) or > 80 cm (women)]. The main outcome variable tested was postprandial endothelial function after a high-fat meal (900 kcal), as evaluated by use of flow-mediated dilation (FMD) and Framingham reactive hyperemia index (fRHI), after each treatment. By use of subgroup analysis, we determined whether the effect was related to the baseline plasma arginine concentration.

Results: In the total population, the effects of SR-arginine supplementation on postprandial endothelial function were mixed and largely varied with baseline fasting arginine concentration (*P*-interaction < 0.05). In the lower half of the population (below the median of 78.2 μmol arginine/L plasma), but not the upper half, SR-arginine supplementation attenuated the postprandial decrease in both FMD (29% decrease with SR-arginine compared with 50% decrease with placebo) and fRHI (5% increase with SR-arginine compared with 49% decrease with placebo), resulting in significantly higher mean ± SEM values with SR-arginine (FMD: 4.0% ± 0.40%; fRHI: 0.41 ± 0.069) than placebo (FMD: 2.9% ± 0.31%; fRHI: 0.21 ± 0.060) at the end of the postprandial period (*P* < 0.05).

Conclusions: Supplementation with low-dose SR-arginine alleviates postprandial endothelial dysfunction in healthy HTW adults when the baseline plasma arginine concentration is relatively low. The benefits of arginine supplementation may be linked to a lower ability to mobilize endogenous arginine for nitric oxide synthesis during a postprandial challenge. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT02354794. *J Nutr* doi: 10.3945/jn.115.227959.

Keywords: arginine metabolism, cardiometabolic risk, dietary arginine, high-fat meal, postprandial period

Introduction

Vascular endothelial dysfunction is present chronically in patients with cardiovascular disease and in subjects presenting with risk factors for cardiovascular diseases and diabetes, such as the

metabolic syndrome, and it is the hallmark of early atherosclerosis (1–5). Endothelial dysfunction results from an impairment of NO synthesis and/or bioavailability (6–8). High-dose supplementation with L-arginine (9–24 g/d), an NO donor, has been

shown to improve endothelial function when it is impaired at baseline (9–11). Under these conditions, the benefits of arginine supplementation have also been observed at low levels of supplementation (3–7 g/d) (11–14).

The effectiveness of arginine supplementation when baseline endothelial function is impaired suggests that it could also be useful in acute conditions that involve a transient impairment of endothelial function, such as during the postprandial period. Indeed, endothelial dysfunction in the postprandial state also involves an impairment of NO synthesis (15–18). Postprandial dysfunction has been observed after a high-fat meal in healthy adults and more markedly in those with risk factors associated with the metabolic syndrome (19–24). However, to our knowledge, few studies have evaluated the effects of arginine supplementation during the postprandial period (25), particularly following low doses of supplementation (26, 27), and none have been conducted in subjects with cardiometabolic risk factors.

Carefully controlled studies of low-dose arginine are important because there is growing evidence that the arginine content in dietary proteins may explain their beneficial effects on endothelial function (26, 28). However, arginine is made available slowly from dietary proteins, which may affect its utilization for NO synthesis. In this respect, we showed in another study that in adults with the hypertriglyceridemic waist (HTW)⁸ phenotype, sustained-release (SR) arginine, which mimics the kinetics of dietary arginine, was used more efficiently for NO synthesis than an immediate-release form (29). At a low level of intake, SR-arginine has been shown to improve endothelial function under fasting conditions (12).

Lastly, we reasoned that the mechanism underlying the effects of arginine supplementation on endothelial dysfunction may be especially evident during a transient decrease in NO synthesis, such as in the postprandial state, so that the benefits of supplementation may vary according to the prevailing arginine status and metabolism. During the present study, we examined plasma arginine concentrations as a predictor of postprandial endothelial function following arginine supplementation. We therefore hypothesized that supplementation with low doses of SR-arginine may improve postprandial endothelial function in adults with cardiometabolic risk factors (in this case, adults with the HTW phenotype) and that this effect could differ between subjects as a function of their baseline arginine concentration.

Methods

Study population

For this study, 36 healthy overweight adults with the HTW phenotype were recruited. The inclusion criteria were age between 18 and 60 y, a

BMI (in kg/m²) of 25–30, a waist circumference of >94 cm for men and >80 cm for women, and a fasting TG concentration of >150 mg/dL. The main noninclusion criteria included obesity (BMI > 30), systolic blood pressure of >150 mm Hg or diastolic blood pressure of >90 mm Hg, and any disease. The full list of noninclusion criteria is in **Supplemental Methods 1**.

Recruitment and ethical aspects

The participants were recruited between October 2013 and January 2014 by the Human Research Center at Avicenne Hospital (CRNH Ile-de-France Human Research Center), and the study was carried out between February and May 2014. The study was approved by the Institutional Review Board Ile de France XI and authorized by the French Agency for the Safety of Medicines and Healthcare Products under the administrative supervision of the French Ministry for Health. This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT02354794. The recruitment details are in **Supplemental Methods 1**, and the flow diagram is shown in **Figure 1**.

Study design and interventions

This was a randomized, double-blind, 2-period crossover, placebo-controlled study with 4-wk treatment periods and a 4-wk wash-out period. The sample size was based on a power calculation, with endothelial function being measured by use of the reactive hyperemia index (RHI) technique as a primary criterion because the variability of this non-operator-dependent technique could be estimated correctly in advance (30). A total of 33 subjects was estimated to ensure 80% power to detect a 20% difference between the treatments, with $\alpha = 0.05$, based on published data (30). In view of the expected drop-out rate, the number of subjects to be randomly assigned was set at 36. Details of the randomization scheme are in **Supplemental Methods 1**.

The study treatments were supplied by Pierre Fabre Médicament as 3 sets of 3 identical capsules to be taken each day (i.e., 9 capsules/d), starting on the day immediately after the first visit. After overnight fasting, the participants were studied on 4 occasions: in the morning before the first day of the treatment periods and during the whole of the last day of each treatment period. During these periods, they received, in randomized order, capsules containing 1.5 g of L-arginine in a sustained-release form (for the SR-arginine treatment) or cellulose and hydroxypropylmethylcellulose (for the placebo), 3 times/d (i.e., 4.5 g/d), this being a dose similar to the average spontaneous dietary intake (~5 g/d) (31). The treatments were matched to a coded numeric identifier so that the research staff, principal investigator, research director, and participants were blinded to the treatment assignment. The participants were instructed to adhere to their usual diet; to maintain their activity level during the course of the study; to abstain from alcohol, caffeine, and foods rich in polyphenols (coffee, tea, and fruit juice) during the 12 h before the start of their visits; and to not take any intense exercise on the day before. They were also instructed to try and ensure that their travel to the center would generate only minimal physical activity. During the morning session, each subject underwent a fasting measurement of endothelium-dependent brachial artery reactivity [flow-mediated dilation (FMD)], directly coupled to a measurement of postischemic digital reactivity (RHI by use of the EndoPAT method), supplemented by a measurement of non-endothelium-dependent brachial artery reactivity [glyceryl trinitrate (GTN)-induced dilation]. During the full-day sessions, simultaneous measurements of FMD and RHI were taken in fasting participants (1 h before a high-fat meal), and then the RHI was measured 2, 4, and 6 h after administration of the high-fat meal. The RHI measurement performed at 4 h was coupled with that of FMD in the same manner as for the fasting measurements. During the last day of supplementation, the first intake of treatment (SR-arginine or placebo) took place 2–3 h before the meal, and the second intake took place 3.5 h after the meal. In order to assess their compliance, the participants were asked to return any unused capsules on arriving for each full-day session.

High-fat meal challenge

The high-fat meal consisted of fresh cream, sucrose, and milk proteins in a light cream with a total energy value of 900 kcal, with the following nutritional composition: 80% of energy supplied by lipids

¹ Supported by a grant from Pierre Fabre Research Institute.

² Author disclosures: E André, F Lantoin-Adam, and P Bunouf are employees of Pierre Fabre Research Institute, which partly funded this research project. This funding included the PhD fellowship for A Deveaux. I Pham, SG West, S Sadi, D Hermier, V Mathé, H Fouillet, J-F Huneau, R Benamouzig, and F Mariotti, no conflicts of interest.

³ Supplemental Methods 1 and Supplemental Figure 1 are available from the "Online Supporting Material" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org>.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: francois.mariotti@agroparistech.fr.

⁸ Abbreviations used: AI, augmentation index; DVP, digital volume pulse; FMD, flow-mediated dilation; fRHI, Framingham reactive hyperemia index; GTN, glyceryl trinitrate; Higher-Arg, participants who had a higher plasma arginine value than the median of the total population; HTW, hypertriglyceridemic waist; Lower-Arg, participants who had a lower plasma arginine value than the median of the total population; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; RHI, reactive hyperemia index; SR, sustained release; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

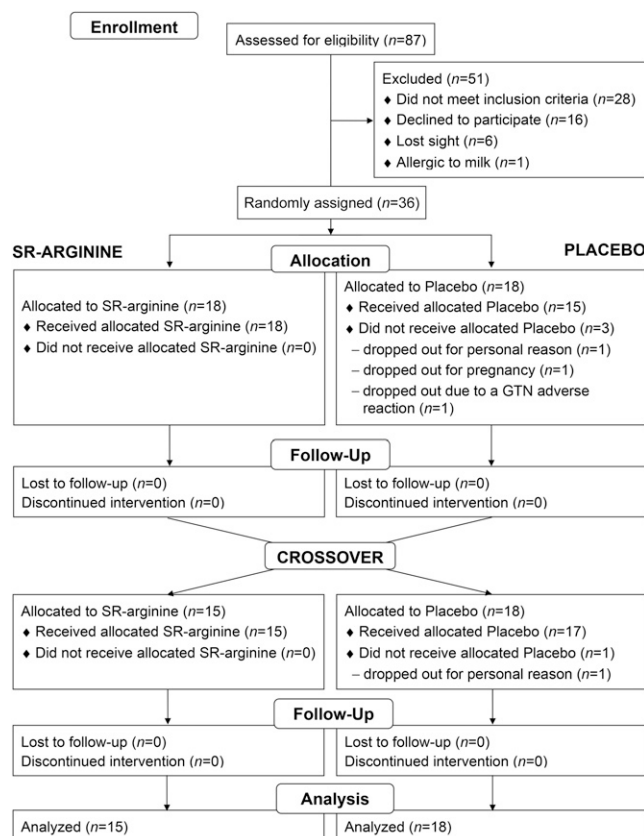


FIGURE 1 Schematic of subject flow and reasons for exclusions. GTN, glyceryl trinitrate; SR-arginine, sustained-release arginine.

(from 30% fat ultra-high temperature-sterilized liquid cream; Carrefour), 13% by carbohydrates (sucrose; Beghin-Say), and 7% by proteins (from an 81.2% protein total milk protein isolate; Ingredia).

Blood sample collection and assays

Blood was drawn via a catheter inserted into a superficial arm vein, and samples were collected in the fasting state during the mornings of the morning and full-day sessions and in the postprandial state (2, 4, and 6 h after ingesting the high-fat meal) during the full-day sessions. The samples were portioned and stored at -20°C for subsequent analyses.

Plasma markers of endothelial function. Plasma concentrations of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), C-reactive protein, and endothelin-1 were determined by use of 2 custom mixed assay kits with antibody-coated beads (Human Luminex Screening Assay; C-reactive protein, endothelin-1, intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and PAI-1; R&D Systems) by use of the Luminex xMAP technology platform for the multiplexing of immunochemical bioassays (BioPlex 200 with HTF system; Bio-Rad).

Biochemical analyses. The fasting lipid profile (TGs, total cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol), insulin, glucose, complete blood count, and postprandial evolution of TGs, glucose, and the complete blood count were determined by use of standard clinical biochemical analyzers. TG and glucose AUCs were calculated by use of the trapezoidal rule. The HOMA-IR was calculated as $[\text{insulin (pmol/L)}]/6.945 \times \text{glucose (mmol/L)}/22.5$. The visceral adiposity index was also calculated, as previously described (32). Briefly, the visceral adiposity index is a sex-specific index based on waist circumference, BMI, TGs, and HDL that indirectly expresses visceral adiposity dysfunction associated with cardiometabolic risk. Plasma amino acid concentrations were assayed by ultra-performance liquid chromatography with UV and mass detection, as previously described (33). Fasting asymmetric dimethyl-

arginine concentrations were measured by use of an ELISA kit (DLD Diagnostika GmbH).

Characterization of participant background diets and physical activity

At the start of the study, a survey of food intake and physical activity was conducted. Using a dedicated and secure website, the participants reported their food intake as three 24-h recalls spaced by ≥ 3 d, one of them being at the weekend. Nutritional values for energy and nutrients were obtained from an aggregated French nutrient database supplemented by databases updated to include new foods and recipes. Physical activity was assessed using the short form of the International Physical Activity Questionnaire. The estimated activity was expressed as metabolic equivalent of task-min/wk according to International Physical Activity Questionnaire scoring strategies (34).

Measurement of flow-mediated dilation, Doppler assessment of reactive hyperemia, and peripheral arterial tonometry

After a 12-h fast, endothelial function was assessed by FMD with high-frequency ultrasound, as described previously (35, 36), in a quiet, dimly lit room at $21\text{--}22^{\circ}\text{C}$. The brachial artery above the elbow of the right arm was scanned in a longitudinal section after a 10-min rest, and continuous cross-sectional images were video recorded at rest (2 min), during cuff inflation (5 min), and during increased blood flow after cuff release (2 min). A cuff inflator set at 250 mm Hg (Hokanson) was placed on the forearm distal to the ultrasound probe in order to induce ischemia. Arterial images were acquired by an external B mode ultrasound imaging device (GE LOGIQ Book XP; GE) equipped with a 10-MHz linear array transducer (8L-RS, GE). All participants were assessed by the same well-trained sonographer. Automated edge detection software (Cardiovascular Suite; Quipu) was used to quantify arterial diameter continuously throughout the test from the videos. This system is based on analyzing B-mode ultrasound images, in which the boundaries of the brachial artery are located by a contour tracking technique. Subpixel precision is achieved by using both a novel edge detection algorithm and the interpolation of a number of edge points. The system was also equipped with an electrocardiogram sync signal to identify diameter values coinciding with onset of the R wave (37). Peak artery diameter was determined as the largest diameter recorded during the 2-min postdeflation segment. Resting diameters were the means of all the diameter values determined on all images collected over a 2-min baseline period. FMD was calculated as the percentage change in arterial diameter at peak dilation compared with baseline and was reported as a percentage. Time averaged mean velocity (m/s) across the cardiac cycle was measured using pulsed Doppler at 2 time points: resting baseline and immediately after cuff release. Flow (mL/min) was calculated as the time averaged mean velocity $\times$ cross-sectional area of the vessel (calculated as $\pi D^2/4$, where D is the diameter as estimated by edge detection).

During the FMD test, the EndoPAT 2000 (Itamar Medical Ltd.) was used to measure relative changes in pulse wave amplitude before and after occlusion (38). The EndoPAT technique had been validated (38) and then used in the Framingham Heart Study, which found significant, inverse associations between EndoPAT scores and multiple cardiovascular disease risk factors (39). Flexible probes were placed on the index fingers of the right (ischemic) and left (control) hands. Measurements were taken at baseline (5 min) and during occlusion (5 min) and reactive hyperemia (5 min) as induced by cuff inflation and deflation during FMD testing. The RHI was calculated as the ratio between the mean pulse wave amplitude during hyperemia (60–120 s of the postocclusion period) and the mean pulse wave amplitude at baseline in the occluded hand divided by the same values in the control hand and then multiplied by a baseline correction factor. The Framingham RHI (fRHI) is an alternative calculation derived from the same raw data and differs in that it uses the 90–120-s period of postocclusion hyperemia, it does not incorporate a baseline correction factor, and it has a natural log transformation applied to the resulting ratio. The fRHI has been shown to correlate with other cardiovascular disease risk markers (39, 40). The EndoPAT device also generates the augmentation index (AI), a measure of vascular stiffness (pulse wave reflection) that is calculated from the shape of the pulse wave recorded by the probes at baseline. AI was also

TABLE 1 Baseline characteristics of overweight adults with the HTW phenotype, in the total population and the Lower-Arg group¹

	Total (n = 33)	Lower-Arg (n = 16)	P value ²
Sex (M), %	73	63	NS
Age, y	45 ± 8.9 (23–59)	45 ± 8.5 (23–59)	NS
Weight, kg	85.3 ± 11.3 (68.0–106)	83.6 ± 12.7 (68.0–106)	NS
Height, m	1.74 ± 0.103 (1.53–1.91)	1.72 ± 0.104 (1.53–1.91)	NS
Waist, cm	101 ± 5.86 (94.0–112)	102 ± 7.11 (94.0–112)	NS
BMI, kg/m ²	28.0 ± 1.92 (23.9–31.5)	28.1 ± 2.09 (24.2–31.5)	NS
VAI	3.9 ± 3.4 (0.85–16)	4.0 ± 2.8 (0.88–11)	NS
SBP, mm Hg	126 ± 17.6 (103–176)	121 ± 14.4 (103–149)	NS
DBP, mm Hg	76 ± 11 (56–97)	76 ± 11 (56–93)	NS
Plasma lipids			
TGs, mmol/L	2.4 ± 1.6 (0.67–8.8)	2.4 ± 1.1 (1.1–4.8)	NS
TC, g/L	2.1 ± 0.40 (1.2–3.1)	2.1 ± 0.23 (1.6–2.4)	NS
LDL-C, g/L	1.2 ± 0.34 (0.65–2.2)	1.2 ± 0.25 (0.78–1.5)	NS
HDL-C, g/L	0.4 ± 0.1 (0.2–0.8)	0.5 ± 0.2 (0.2–0.8)	NS
Glucose metabolism			
Plasma glucose, mmol/L	6.1 ± 0.69 (5.3–8.2)	6.3 ± 0.88 (5.3–8.2)	NS
Plasma insulin, pmol/mL	108 ± 87.3 (30.0–502)	121 ± 113 (41.8–502)	NS
HOMA-IR	4.3 ± 3.7 (1.1–20)	5.0 ± 4.8 (1.6–20)	NS
Plasma markers of endothelial function and inflammation			
ICAM-1, ng/mL	46 ± 26 (0.81–97)	47 ± 23 (77–89)	NS
VCAM-1, ng/mL	76.6 ± 39.0 (28.0–233)	69.0 ± 27.8 (28.0–124)	NS
E-Selectin, ng/mL	4.1 ± 1.3 (1.9–7.0)	3.6 ± 1.1 (1.9–5.9)	NS
P-Selectin, ng/mL	3.9 ± 1.0 (2.3–6.1)	3.7 ± 1.0 (2.5–5.7)	NS
PAI-1, ng/mL	2.2 ± 1.0 (0.40–4.9)	2.2 ± 1.2 (0.76–4.9)	NS
Endothelin-1, pg/mL	2.9 ± 1.4 (1.4–6.1)	2.5 ± 1.0 (1.5–5.5)	NS
CRP, ng/mL	291 ± 5.46 (12.4–2960)	377 ± 723 (61.4–2960)	NS
Plasma arginine-related amino acids			
Arginine, μmol/L	77.6 ± 18.3 (41.2–136)	63.8 ± 9.75 (41.2–76.5)	<0.01
Citrulline, μmol/L	32.2 ± 6.83 (18.2–49.7)	29.9 ± 6.18 (18.2–38.4)	NS
Ornithine, μmol/L	54.0 ± 11.8 (29.3–85.7)	48.4 ± 10.5 (29.3–65.1)	NS
ADMA, μmol/L	0.46 ± 0.19 (0.11–0.83)	0.43 ± 0.20 (0.11–0.83)	NS
Vascular and hemodynamic parameters			
FMD, % artery diameter change	5.2 ± 2.0 (2.7–9.6)	4.8 ± 2.2 (2.7–9.6)	NS
Basal arterial diameter, mm	4.5 ± 0.88 (3.2–7.0)	4.4 ± 0.92 (3.2–6.8)	NS
Maximal arterial diameter, mm	4.7 ± 0.91 (3.4–7.2)	4.6 ± 0.96 (3.4–7.0)	NS
Basal blood flow, mL/min	122 ± 78.3 (12.0–304)	100 ± 59.0 (17.0–237)	NS
Hyperemic blood flow, mL/min	609 ± 301 (204–1690)	576 ± 258 (204–1070)	NS
GTN-ID, % artery diameter change	16.8 ± 6.09 (6.27–33.1)	16.9 ± 6.05 (9.63–27.7)	NS
RHI	2.2 ± 0.72 (0.93–4.6)	2.4 ± 0.82 (1.2–4.6)	NS
Framingham RHI	0.52 ± 0.38 (−0.12 to 1.3)	0.61 ± 0.40 (−0.10 to 1.3)	NS
AI	8.7 ± 19 (−12 to 62)	2.1 ± 11 (−12 to 26)	NS
AI at 75 bpm	2.6 ± 19 (−23 to 56)	−3.1 ± 13 (−23 to 18)	NS
HR, beats/min	65.1 ± 10.7 (47.0–104)	66.6 ± 13.6 (47.0–104)	NS
DVP-RI	69 ± 14 (23–97)	67 ± 17 (23–97)	NS
DVP-SI	9.2 ± 2.0 (6.1–16)	8.3 ± 1.4 (6.1–11)	NS
Nutritional and activity parameters			
Estimated usual energy intake, kcal/d	1910 ± 782 (483–4550)	1870 ± 825 (483–4550)	NS
Protein, % total energy	17 ± 4.4 (10–31)	16 ± 3.3 (10–24)	<0.05
Lipid, % total energy	35 ± 9.5 (9.6–64)	35 ± 9.1 (22–64)	NS
Carbohydrate, % total energy	48 ± 10 (15–70)	49 ± 9.9 (15–64)	NS
Total physical activity, MET-min/wk	3370 ± 3920 (210–18,400)	3220 ± 3180 (210–10,200)	NS

¹ All values are means ± SDs, ranges in parentheses, unless otherwise indicated. NS, $P \geq 0.05$. ADMA, asymmetric dimethyl-arginine; AI, augmentation index; AI at 75 bpm, AI standardized for heart rate of 75 beats/min; CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; DVP-RI, digital volume pulse-reflection index; DVP-SI, digital volume pulse-stiffness index; FMD, flow-mediated dilation; GTN-ID, glyceryl trinitrate-induced dilation; HDL-C, HDL cholesterol; HR, heart rate; HTW, hypertriglyceridemic waist; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; LDL-C, LDL cholesterol; Lower-Arg, participants who had a lower plasma arginine value than the median of the total population; MET, metabolic equivalent of task; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; RHI, reactive hyperemia index; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; VAI, visceral adiposity index; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

² P value is based on a Student's *t* test between the total study population and the Lower-Arg group, except for Sex (M), %, which was based on a χ^2 test.

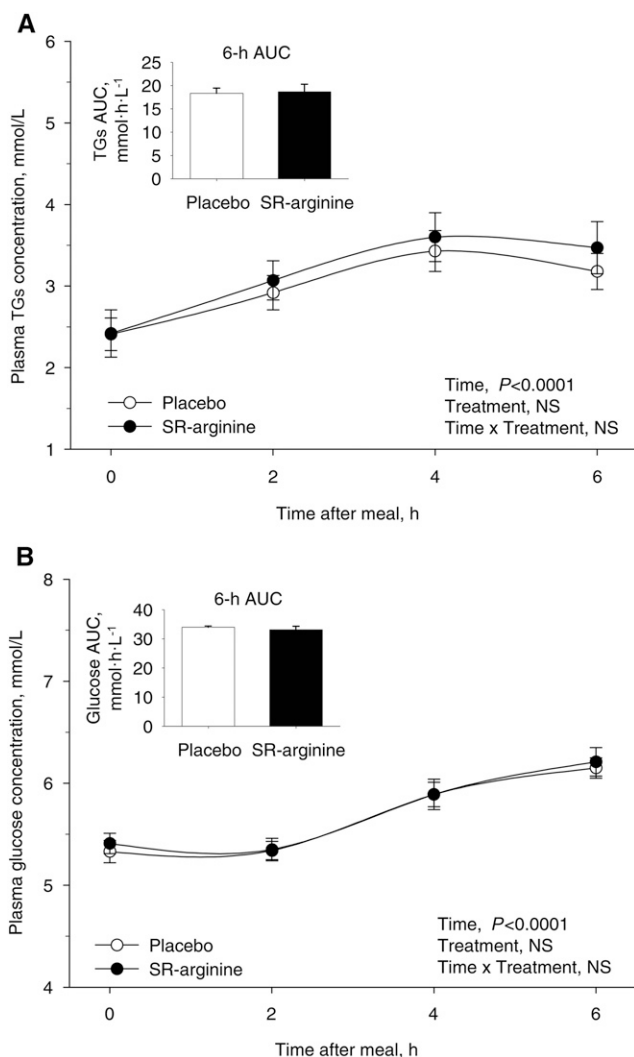


FIGURE 2 Postprandial plasma TGs (A) and glucose (B) and AUC values after a high-fat meal in overweight adults with the hypertriglyceridemic waist phenotype who received placebo and SR-arginine treatments, each for 4 wk. Data are means $\pm$ SEMs, $n = 33$ or 32 . NS, $P \geq 0.05$. SR-arginine, sustained-release arginine.

adjusted to a heart rate of 75 beats/min in order to correct for the independent effect of heart rate on this measurement (41).

The fasting FMD test was supplemented by a test of non-endothelium-dependent arterial function (GTN-induced dilation, also measured with high-frequency ultrasound) with 0.30 mg of GTN, a vasodilator administered in a sublingual spray that acts directly on the relaxation of smooth muscle. Vascular reactivity was calculated as the ratio between the peak diameter of the brachial artery measured 2 min after the GTN spray and the basal diameter. This measurement was used as a control of endothelium-dependent function.

Digital volume pulse (DVP) signals were also obtained during fasting and then 2, 4, and 6 h after the meal by finger photoplethysmography using pulse contour analysis (Pulse Trace device, Micro Medical). The DVP was analyzed to derive the stiffness index (m/s) as the inverse of the time between the first and second peaks of the pulse wave multiplied by the height of the subject and the reflection index (%) as the height of the second peak divided by that of the first peak (42, 43).

Statistics

Data are reported as means $\pm$ SEMs. Statistical analyses were performed with SAS (version 9.3; SAS Institute). Significance was set at $P < 0.05$. Data were analyzed using mixed models (PROC MIXED) for repeated measurements with covariance structure modeling. Posttreat-

ment values were explained by the following fixed factors: time before or after meal (0 and 4 h postprandial or 0, 2, 4, and 6 h postprandial), treatment (SR-arginine or placebo), period of treatment (first or second), treatment by time, and treatment by period (to test for the possible existence of a carryover) interactions. Fasting values before treatment were introduced in the model as a covariate, which was the mean value of the 2 measurements. Treatment and time were considered as repeated factors on subject. Subject was analyzed as a random effect. Multiple comparisons between treatments at different postprandial time points were corrected for multiplicity using the Hochberg-Bonferroni method, except for comparisons of fasting values, which were preplanned.

Subgroup analysis according to the baseline fasting arginine value

Based on the median plasma arginine concentration at inclusion in the study ($78.2 \mu\text{mol/L}$), we separated the population into relatively higher (Higher-Arg, i.e., with values greater than or equal to the median) and relatively lower (Lower-Arg, i.e., with values lower than the median) fasting arginine groups. The distribution of plasma arginine concentration at study entry is in **Supplemental Figure 1**. Differences in baseline characteristics between the total study population and the Lower-Arg group were analyzed using Student's t test, except for the sex parameter, which was based on a χ^2 test. Otherwise, data were analyzed using the model described above, with the addition of group, treatment by group interaction, and treatment by time by group interaction. Because we obtained significant treatment by group interaction and/or treatment by time by group interaction, we separately analyzed the data from the Lower-Arg and Higher-Arg group, as described above.

Results

As shown in Figure 1, we analyzed data from 33 participants (complete data for 32 and only SR-arginine treatment data for 1). Compliance with arginine supplementation reached $>84\%$ for all participants during all periods, as determined by the return of capsules. Until the end of the follow-up, no adverse effects were reported.

Metabolic and nutritional characterization of the participants.

By design, all participants exhibited the HTW phenotype. The sample was middle-aged, normotensive, and overweight, but otherwise healthy (Table 1). Their daily intakes of energy and specific macronutrients were in line with the usual recommended dietary intakes and Acceptable Macronutrient Distribution Range. Compared with the total HTW population, Lower-Arg HTW participants had lower baseline plasma arginine concentration (by construction, $P < 0.01$) and a lower protein intake ($P < 0.05$) (Table 1).

Effects of the high-fat meal. TG and glucose concentrations increased significantly at 2–4 h postmeal (time effect, $P < 0.0001$), and the AUCs were similar with both SR-arginine and placebo (Figure 2). Irrespective of treatment assignment, as expected, there was a significant decrease ($38\% \pm 7\%$) in FMD ($P < 0.0001$) (Table 2) after the high-fat meal. We also observed a significant increase in heart rate at 2 h after the meal (time effect, $P < 0.01$) (Table 2). In addition, other vascular measurements decreased significantly following the meal (fRHI, AI, AI at 75 beats/min, DVP-reflection index, DVP-stiffness index, and time effect; $P < 0.05$) (Table 2). Lastly, there was a significant increase in the number of leukocytes, platelets, and neutrophils at 2 h after the meal, and there were increases in the number of eosinophils, lymphocytes, and monocytes as from 4 h after the meal (time effect; $P < 0.01$) (Table 3), whereas PAI-1 concentration decreased significantly (time effect, $P < 0.05$) (Table 3).

Effects of 4 wk of SR-arginine on fasting measurements.

As expected, fasting plasma arginine increased by 35% during SR-arginine treatment ($P < 0.0001$) and not with placebo (Table 4).

TABLE 2 Cardiovascular parameters in overweight adults with the HTW phenotype who received placebo and SR-Arg treatments, each for 4 wk¹

	Before supplementation	After supplementation				P value ²		
		Fasting, 0 h	Postmeal, 2 h	Postmeal, 4 h	Postmeal, 6 h	Time	Treatment	Interaction
RHI						NS	NS	NS
Placebo	2.1 ± 0.093	2.0 ± 0.13	2.0 ± 0.11	1.9 ± 0.080	1.9 ± 0.098			
SR-Arg	2.2 ± 0.13	2.0 ± 0.077	2.0 ± 0.11	1.8 ± 0.068	1.9 ± 0.088			
Mean ³	2.1 ± 0.078	2.0 ± 0.073	2.0 ± 0.080	1.9 ± 0.052	1.9 ± 0.065			
AI						<0.0001	NS	NS
Placebo	8.2 ± 3.1	11 ± 2.8	3.2 ± 2.5	5.4 ± 2.4	9.4 ± 2.6			
SR-Arg	9.0 ± 3.3	9.0 ± 3.2	2.4 ± 2.5	4.4 ± 2.4	7.6 ± 2.6			
Mean	8.6 ± 2.2	9.8 ± 2.1	2.8 ± 1.7*	4.9 ± 1.7*	8.5 ± 1.8			
AI at 75 bpm						<0.0001	NS	NS
Placebo	1.0 ± 3.0	2.6 ± 2.8	−1.2 ± 2.4	−0.94 ± 2.5	3.6 ± 2.4			
SR-Arg	1.9 ± 3.2	1.0 ± 3.0	−0.94 ± 2.3	−0.70 ± 2.4	2.5 ± 2.3			
Mean	1.2 ± 2.2	1.8 ± 2.1	−1.1 ± 1.6*	−0.82 ± 1.7	3.0 ± 1.7			
HR, beats/min						<0.0001	NS	NS
Placebo	63 ± 1.5	62 ± 1.3	68 ± 1.4	66 ± 1.5	66 ± 1.6			
SR-Arg	63 ± 1.9	62 ± 1.6	70 ± 1.6	67 ± 1.7	67 ± 1.8			
Mean	63 ± 1.2	62 ± 1.0	69 ± 1.7*	66 ± 1.1*	66 ± 1.2*			
DVP-RI						<0.05	NS	NS
Placebo	71 ± 2.1	71 ± 2.8	65 ± 2.6	67 ± 2.1	70 ± 2.2			
SR-Arg	71 ± 2.5	71 ± 2.2	68 ± 2.4	69 ± 1.5	71 ± 1.6			
Mean	71 ± 1.6	71 ± 1.7	67 ± 1.7*	68 ± 1.3	71 ± 1.3			
DVP-SI						<0.05	NS	NS
Placebo	9.2 ± 0.30	9.4 ± 0.35	8.2 ± 0.36	9.1 ± 0.49	9.0 ± 0.34			
SR-Arg	9.8 ± 0.37	9.5 ± 0.33	9.0 ± 0.41	9.2 ± 0.28	8.9 ± 0.29			
Mean	9.5 ± 0.24	9.4 ± 0.24	8.6 ± 0.28*	9.2 ± 0.28	9.0 ± 0.22*			
Basal artery diameter, mm						<0.05	NS	<0.01
Placebo	4.4 ± 0.14	4.4 ± 0.14		4.6 ± 0.14				
SR-Arg	4.5 ± 0.15	4.4 ± 0.14		4.4 ± 0.14				
Mean	4.5 ± 0.10	4.4 ± 0.099		4.5 ± 0.097*				
Peak artery diameter, mm						NS	NS	<0.05
Placebo	4.7 ± 0.14	4.7 ± 0.15		4.7 ± 0.14				
SR-Arg	4.7 ± 0.15	4.7 ± 0.14		4.6 ± 0.14				
Mean	4.7 ± 0.10	4.7 ± 0.10		4.7 ± 0.098				
Basal blood flow, mL/min						NS	NS	NS
Placebo	117 ± 13.2	152 ± 16.4		162 ± 14.4				
SR-Arg	128 ± 16.7	147 ± 18.1		147 ± 15.1				
Mean	123 ± 10.6	149 ± 12.2		155 ± 10.4				
Hyperemic blood flow, mL/min						NS	NS	NS
Placebo	621 ± 52.1	676 ± 65.6		717 ± 51.9				
SR-Arg	659 ± 56.9	671 ± 38.3		630 ± 50.7				
Mean	640 ± 38.4	674 ± 37.4		673 ± 36.4				
GTN-ID, % artery diameter change							NS	
Placebo	17.0 ± 1.21	15.7 ± 0.889						
SR-Arg	17.0 ± 1.02	16.9 ± 1.02						
Mean	17.0 ± 0.787	16.3 ± 0.674						

¹ All values are means ± SEMs, $n = 33$ or 32 . *Different from fasting baseline for the mean (treatment-collapsed) values, $P < 0.05$. NS, $P \geq 0.05$. AI, augmentation index; AI at 75 bpm, AI standardized for heart rate of 75 beats/min; DVP-RI, digital volume pulse-reflection index; DVP-SI, digital volume pulse-stiffness index; GTN-ID, glyceryl trinitrate-induced dilation; HR, heart rate; HTW, hypertriglyceridemic waist; RHI, reactive hyperemia index; SR-Arg, sustained-release arginine.

² P values are for the main effect of time, treatment, and the time by treatment interaction as analyzed using a mixed model. These P values refer only to the placebo and SR-Arg data, the mean data being here shown for information. None of the multiple comparisons, corrected for multiplicity with the Hochberg-Bonferroni procedure, were significant.

³ Mean refers to the total sample irrespective of treatment.

Fasting plasma ornithine also increased by 31% following SR-arginine ($P < 0.0001$) (Table 4). The fasting FMD was significantly higher after placebo than after SR-arginine ($P < 0.05$). None of the other variables differed in the fasting state after 4 wk of supplementation with SR-arginine compared with placebo (Tables 2 and 3; lipid data not shown).

Effects of SR-arginine on postprandial changes in vascular function. After the 4-wk supplementation period, postprandial reductions in FMD after the meal were significantly lower after SR-arginine than after placebo (time by treatment interaction, $P < 0.0001$) (Figure 3A). However, as reported above, fasting FMD was lower after SR-arginine than after

TABLE 3 Plasma markers of endothelial function and inflammation in overweight adults with the HTW phenotype who received placebo and SR-Arg treatments, each for 4 wk¹

	Before supplementation	After supplementation				<i>P</i> value ²		
		Fasting, 0 h	Postmeal, 2 h	Postmeal, 4 h	Postmeal, 6 h	Time	Treatment	Interaction
ICAM-1, ng/mL						NS	NS	NS
Placebo	45 ± 4.4	44 ± 4.8	42 ± 4.6	40 ± 4.5	42 ± 4.3			
SR-Arg	45 ± 4.8	41 ± 4.4	42 ± 4.4	43 ± 4.3	44 ± 4.6			
Mean ³	45 ± 3.2	43 ± 3.2	42 ± 3.2	42 ± 3.1	43 ± 3.1			
VCAM-1, ng/mL						<0.01	NS	<0.05
Placebo	72 ± 4.2	66 ± 4.3	65 ± 4.4	69 ± 5.0	73 ± 4.7			
SR-Arg	77 ± 7.0	71 ± 3.9	63 ± 4.2	69 ± 4.2	71 ± 4.1			
Mean	74 ± 4.1	68 ± 2.9	64 ± 3.0	69 ± 3.2	72 ± 3.1			
E-Selectin, ng/mL						NS	NS	NS
Placebo	3.9 ± 0.22	3.7 ± 0.21	3.6 ± 0.22	3.7 ± 0.27	3.8 ± 0.22			
SR-Arg	4.1 ± 0.24	3.8 ± 0.20	3.6 ± 0.23	3.7 ± 0.21	3.6 ± 0.18			
Mean	4.0 ± 0.16	3.7 ± 0.14	3.6 ± 0.16	3.7 ± 0.17	3.7 ± 0.14			
P-Selectin, ng/mL						NS	NS	NS
Placebo	3.8 ± 0.22	3.5 ± 0.15	3.5 ± 0.16	3.5 ± 0.17	3.7 ± 0.15			
SR-Arg	3.9 ± 0.18	3.7 ± 0.15	3.6 ± 0.17	3.7 ± 0.15	3.7 ± 0.14			
Mean	3.9 ± 0.12	3.6 ± 0.11	3.6 ± 0.12	3.6 ± 0.11	3.7 ± 0.10			
ET-1, pg/mL						NS	NS	NS
Placebo	2.8 ± 0.24	2.9 ± 0.25	2.8 ± 0.24	2.8 ± 0.22	2.9 ± 0.26			
SR-Arg	3.0 ± 0.27	3.0 ± 0.25	3.1 ± 0.28	3.0 ± 0.29	3.1 ± 0.26			
Mean	2.9 ± 0.18	2.9 ± 0.18	2.9 ± 0.18	2.9 ± 0.18	3.0 ± 0.18			
PAI-1, ng/mL						<0.0001	NS	NS
Placebo	2.0 ± 0.17	1.6 ± 0.15	1.1 ± 0.097	0.89 ± 0.063	0.98 ± 0.066			
SR-Arg	2.3 ± 0.19	1.9 ± 0.19	1.1 ± 0.10	0.88 ± 0.072	0.94 ± 0.093			
Mean	2.1 ± 0.13	1.8 ± 0.12	1.1 ± 0.070*	0.89 ± 0.047*	0.96 ± 0.057*			
CRP, ng/mL						<0.05	NS	NS
Placebo	252 ± 81.8	295 ± 103	267 ± 78.2	229 ± 42.2	303 ± 90.8			
SR-Arg	285 ± 69.7	268 ± 60.1	228 ± 62.8	234 ± 55.9	280 ± 79.8			
Mean	269 ± 57.2	282 ± 59.1	247 ± 49.6	232 ± 34.9	291 ± 60.0			
Leukocytes, ×10 ⁹ /L						<0.0001	NS	NS
Placebo		6.5 ± 0.29	6.9 ± 0.30	7.4 ± 0.30	7.3 ± 0.27			
SR-Arg		6.6 ± 0.30	7.0 ± 0.31	7.8 ± 0.37	7.7 ± 0.37			
Mean		6.5 ± 0.21	7.0 ± 0.22*	7.6 ± 0.24*	7.5 ± 0.23*			
Platelets, ×10 ⁹ /L						<0.0001	NS	NS
Placebo		234 ± 8.72	241 ± 9.01	249 ± 9.15	243 ± 10.2			
SR-Arg		239 ± 9.00	248 ± 9.05	253 ± 10.1	245 ± 11.1			
Mean		237 ± 6.23	244 ± 6.35*	251 ± 6.79*	244 ± 7.52			
Neutrophils, ×10 ⁹ /L						<0.01	NS	NS
Placebo		3.7 ± 0.24	4.0 ± 0.25	4.1 ± 0.24	4.0 ± 0.21			
SR-Arg		3.7 ± 0.23	4.2 ± 0.26	4.5 ± 0.33	4.4 ± 0.35			
Mean		3.7 ± 0.17	4.1 ± 0.18*	4.3 ± 0.20*	4.2 ± 0.21*			
Eosinophils, ×10 ⁹ /L						<0.0001	NS	NS
Placebo		0.20 ± 0.018	0.19 ± 0.018	0.23 ± 0.021	0.24 ± 0.019			
SR-Arg		0.18 ± 0.015	0.19 ± 0.016	0.24 ± 0.018	0.24 ± 0.019			
Mean		0.19 ± 0.012	0.19 ± 0.012	0.23 ± 0.014*	0.24 ± 0.013*			
Lymphocytes, ×10 ⁹ /L						<0.0001	NS	NS
Placebo		2.0 ± 0.068	2.1 ± 0.070	2.4 ± 0.089	2.5 ± 0.084			
SR-Arg		2.1 ± 0.090	2.2 ± 0.087	2.4 ± 0.10	2.5 ± 0.12			
Mean		2.1 ± 0.057	2.1 ± 0.056	2.4 ± 0.067*	2.5 ± 0.073*			
Monocytes, ×10 ⁹ /L						<0.01	NS	NS
Placebo		0.41 ± 0.023	0.41 ± 0.019	0.45 ± 0.023	0.44 ± 0.024			
SR-Arg		0.42 ± 0.024	0.40 ± 0.021	0.45 ± 0.023	0.42 ± 0.020			
Mean		0.42 ± 0.017	0.41 ± 0.014	0.45 ± 0.016*	0.43 ± 0.016			

¹ All values are means ± SEMs, *n* = 33 or 32. *Significantly different from fasting baseline for the mean (treatment-collapsed) values, *P* < 0.05. NS, *P* ≥ 0.05. CRP, C-reactive protein; ET-1, endothelin-1; HTW, hypertriglyceridemic waist; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; SR-Arg, sustained-release arginine; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

² *P* values are for the main effect of time, treatment, and the time by treatment interaction as analyzed using a mixed model. These *P* values refer only to the placebo and SR-Arg data, the mean data being here shown for information. None of the multiple comparisons, corrected for multiplicity with the Hochberg-Bonferroni procedure, were significant.

³ Mean refers to the total samples irrespective of treatment.

TABLE 4 Fasting plasma parameters of arginine metabolism in overweight adults with the HTW phenotype who received placebo and SR-Arg treatments, each for 4 wk¹

	Baseline	After treatment	P value ²		
			Time	Treatment	Interaction
Arginine, $\mu\text{mol/L}$			<0.001	<0.0001	<0.0001
Placebo	82.9 $\pm$ 3.19	76.1 $\pm$ 2.79			
SR-Arg	81.6 $\pm$ 2.94	110 $\pm$ 3.76			
Citrulline, $\mu\text{mol/L}$			NS	NS	NS
Placebo	32.6 $\pm$ 1.03	30.9 $\pm$ 1.48			
SR-Arg	31.5 $\pm$ 1.21	31.1 $\pm$ 1.28			
Ornithine, $\mu\text{mol/L}$			<0.01	<0.05	<0.001
Placebo	53.4 $\pm$ 2.27	52.7 $\pm$ 2.72			
SR-Arg	51.4 $\pm$ 2.39	67.3 $\pm$ 3.25			
ADMA, $\mu\text{mol/L}$			<0.05	NS	NS
Placebo	0.52 $\pm$ 0.039	0.55 $\pm$ 0.039			
SR-Arg	0.53 $\pm$ 0.032	0.64 $\pm$ 0.041			

¹ All values are means $\pm$ SEMs, $n = 33$ or 32 . NS, $P \geq 0.05$. ADMA, asymmetric dimethyl-arginine; HTW, hypertriglyceridemic waist; SR-Arg, sustained-release arginine.

² P values are for the main effect of treatment as analyzed using a mixed model.

placebo. There was no significant difference in FMD between SR-arginine and placebo 4 h after the meal.

SR-arginine supplementation did not affect fasting and postprandial fRHI values ($P \geq 0.05$) (Figure 3B). After the placebo but not after SR-arginine, basal artery diameter increased after the meal (time by treatment effect, $P < 0.01$) (Table 2). Lastly, the postprandial decrease in VCAM concentrations was slightly more marked after SR-arginine than placebo (time by treatment interaction, $P < 0.05$).

Subgroup analysis: lower plasma arginine as a predictor of the favorable effect of arginine supplementation on postprandial endothelial function. We found that the baseline arginine concentration significantly modified the effects of arginine supplementation. This was shown by significant interactions between the baseline plasma arginine concentration (Lower-Arg compared with Higher-Arg) and the effect of SR-arginine supplementation on postprandial changes in FMD (P -interaction < 0.05) (Figure 3) and fRHI (P -interaction < 0.01) (Figure 3).

In participants with higher baseline plasma arginine concentration, all results were statistically similar to those found in the total population. In contrast, in individuals with lower plasma arginine concentrations, SR-arginine treatment (compared with placebo) clearly blunted the postprandial decrease in both FMD (50% decrease with placebo compared with 29% with SR-arginine; time by treatment interaction, $P < 0.01$) (Figure 4A) and fRHI (49% decrease with placebo and 5% increase with SR-arginine; time by treatment interaction, $P < 0.05$) (Figure 4B). Furthermore, fasting FMD (0 h) did not differ after SR-arginine or placebo but, 4 h after the meal, the FMD was significantly higher after SR-arginine than after the placebo ($P < 0.05$). fRHI at 6 h after the meal was also significantly higher with SR-arginine than with placebo ($P < 0.05$). In the Lower-Arg group, we did not observe any significant differences in fasting FMD and fRHI (Figure 4).

Discussion

The principal finding of this study is that SR-arginine supplementation blunted postprandial endothelial dysfunction, particularly in the population with lower baseline plasma arginine

concentration. In the postprandial state, as anticipated, the high-fat meal resulted in a substantial relative decrease in FMD ($\sim 38\% \pm 7\%$ at 4 h) and fRHI ($\sim 23\% \pm 4\%$ at 4–6 h). fRHI is an alternative RHI that was proposed by the Framingham Heart Study team and is usually largely correlated to RHI but displays a more robust relation with CVD risk factors. Unlike fRHI, RHI did not significantly decrease after the meal, which was indeed consistent with many previous reports (44, 45). The marked decrease in FMD was in line with the postprandial increase in plasma TGs and glucose, and it was associated with an increase in some markers of systemic inflammation. Numerous previous

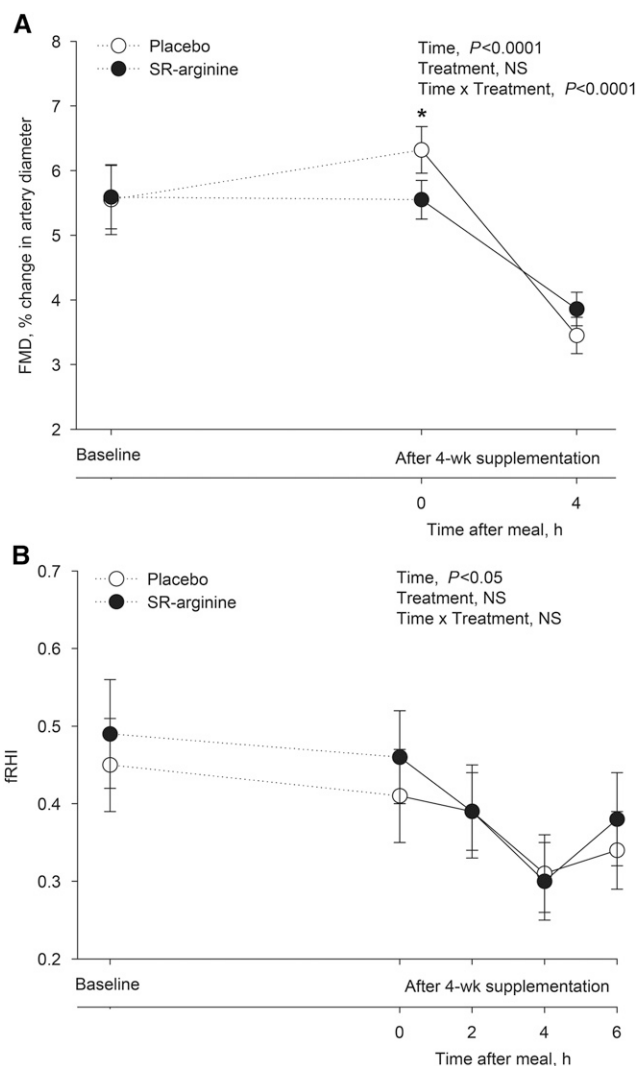


FIGURE 3 Evolution of FMD (A) and fRHI (B), in overweight adults with the hypertriglyceridemic waist phenotype who received placebo and SR-arginine treatments, each for 4 wk, in the fasting state (dotted lines, first bottom axis) and in the postprandial period after a high-fat meal (solid lines, second bottom axis). Data are means $\pm$ SEMs, $n = 33$ or 32 . Significance (mixed model for repeated measures) in the postprandial period: interaction between the baseline plasma arginine concentration (lower compared with higher) and the effect of SR-arginine supplementation on postprandial changes in FMD (P -interaction < 0.05) and fRHI (P -interaction < 0.01). When there was a significant treatment by time interaction, asterisks indicate differences between placebo and SR-arginine (tested as a preplanned contrast for time 0 and Hochberg-Bonferroni corrected contrasts for the other time-points): *Different from placebo, $P < 0.05$. NS, $P \geq 0.05$. FMD, flow-mediated dilation; fRHI, Framingham-reactive hyperemia index; SR-arginine, sustained-release arginine.

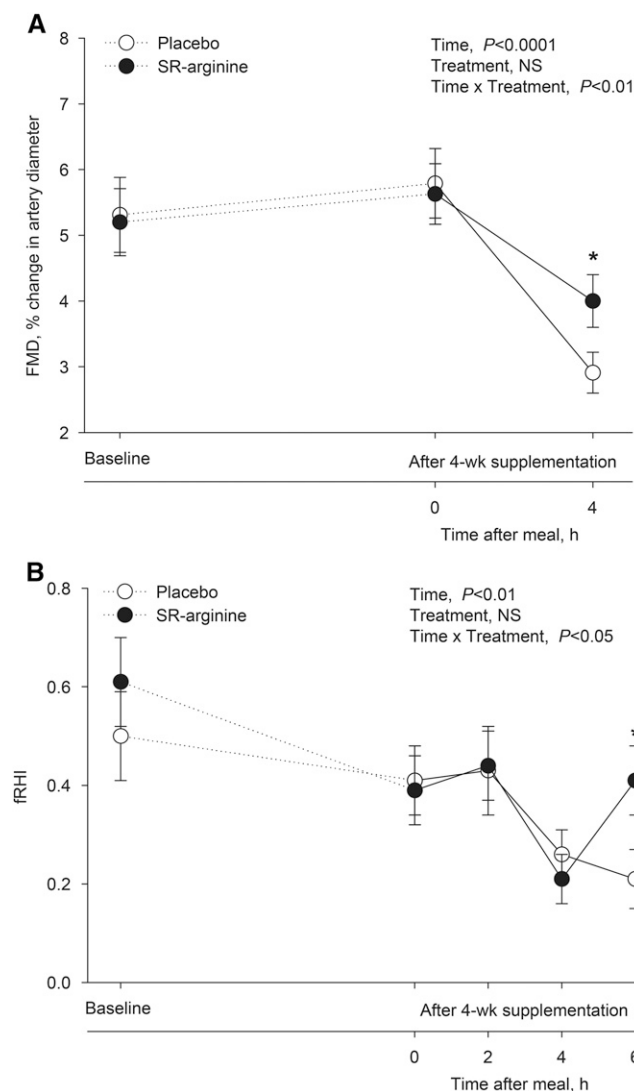


FIGURE 4 Evolution of FMD (A) and fRHI (B) in overweight adults with the hypertriglyceridemic waist phenotype and lower baseline arginine concentrations who received placebo and SR-arginine treatments, each for 4 wk, in the fasting state (dotted lines, first bottom axis) and in the postprandial period after a high-fat meal (full lines, second bottom axis). Data are means $\pm$ SEMs, $n = 16$. Significance (mixed model for repeated measures) with fasting data: supplementation, $P < 0.05$ on fRHI. When there was a significant treatment by time interaction, asterisks indicate differences between placebo and SR-arginine (tested as a preplanned contrast for time 0 and Hochberg-Bonferroni corrected contrasts for the other timepoints). *Different from placebo, $P < 0.05$. NS, $P \geq 0.05$. FMD, flow-mediated dilation; fRHI, Framingham-reactive hyperemia index; SR-arginine, sustained-release arginine.

studies have shown that a high-fat meal induces acute postprandial inflammation (46–48).

In the sample as a whole, SR-arginine supplementation attenuated postprandial endothelial dysfunction (time by treatment interaction), although this effect was not corroborated by a significantly higher FMD value at the end of the postprandial period. We could not exclude the possibility that such an effect of SR-arginine on the postprandial decrease in FMD may be related to the higher fasting FMD values during placebo treatment. It was indeed unexpected that fasting FMD increased with the placebo and not with SR-arginine. Furthermore, we also noted that the basal artery diameter increased during the

postprandial period with the placebo, which may have lowered the FMD values. Nonetheless, a lower postprandial decrease in FMD with arginine supplementation was consistent with the few previous studies in the literature, although they were performed using different doses and conditions and showed that L-arginine supplements acutely attenuated the effects of a high-fat meal on endothelial function in healthy adults (25, 27). Bai et al. (11) showed that oral L-arginine was effective in improving fasting endothelial function when the baseline FMD was low. A 38% decrease in FMD 4 h after the meal was found during our study, which is comparable to the differences ascribed to the presence of risk factors in healthy adults or to a difference between healthy subjects with risk factors and patients with cardiovascular or diabetic disease (11, 49). A postprandial decrease in FMD, like a low basal FMD, may therefore result from decreased NO synthesis, which could be reversible with L-arginine supplementation (11).

A further reason why our results did not demonstrate a favorable effect of SR-arginine supplementation on fasting endothelial function could be that the healthy overweight adults we studied did not display a marked impairment in baseline fasting endothelial function. However, Böger et al. (12) reported that oral SR-arginine supplementation improved fasting endothelial function in healthy adults with risk factors. The discrepancy between the results of the 2 studies may originate from the different study populations involved. The Böger study participants were older than ours, and they were mostly hypercholesterolemic, obese, or smokers, whereas in our study the participants were selected to present the HTW phenotype and were overweight but not obese or smokers.

This is the first study, to our knowledge, to report that the vascular effect of L-arginine supplementation varies depending on background arginine status. Indeed, baseline arginine concentration significantly modified the effects of arginine supplementation. In contrast with the mitigated results in the total population, subgroup analysis showed that in participants with lower fasting plasma arginine concentration, SR-arginine supplementation clearly alleviated postprandial endothelial dysfunction, as shown by both endothelial endpoints (FMD and fRHI), and resulted in significantly higher FMD and fRHI values at the end of the postprandial period when compared with the placebo. That the effect of arginine supplementation depends on prevailing arginine status could only be hypothesized from fragmented data in the literature. Some studies have shown that increasing arginine availability can restore cellular NO production and contribute to regulating the inflammatory process in situations of low plasma arginine concentrations (in diabetic obese rats or fructose-fed rats), reflecting impaired arginine metabolism (50, 51). Similarly, there have been reports of improved NO synthesis after arginine supplementation in patients with sickle cell disease during a vaso-occlusive crisis, when baseline plasma arginine concentrations are low (46 $\mu\text{mol/L}$) and characteristic of “arginine deficiency” states in other clinical conditions (52, 53).

Why arginine supplementation exerted beneficial effects on endothelial function when our healthy overweight adults had lower baseline arginine concentration remains speculative. One possible reason may be that in these participants, oral arginine compensated for a lower basal availability of endogenous arginine for NO synthesis, and this priming effect would be apparent and effective in a situation in which the arginine-NO pathway is challenged, such as during the postprandial phase (15–18). However, the arginine concentration in the systemic circulation poorly reflects its utilization, because this compartment is not a direct precursor of NO (54, 55). There is therefore no simple relation

between plasma arginine concentration and NO synthesis, in either the fasting or postprandial phase. Nonetheless, basal arginine concentrations are considered to be regulated mainly by arginine degradation (56–58). Baseline concentrations may therefore reflect the underlying metabolic configuration (i.e., the balance between de novo synthesis, dietary intake, and degradation). A lower baseline concentration may thus be indicative of less ability to mobilize endogenous arginine to support NO synthesis when this is acutely jeopardized.

In conclusion, this study showed that arginine supplementation, at a dose and in a form mimicking an increase in dietary intake, alleviates endothelial dysfunction in the postprandial state when fasting plasma arginine concentrations were lower. Arginine supplementation did not improve fasting endothelial function, but, in line with the principle that the beneficial effects of arginine supplements are most evident when endothelial function is impaired, it did indeed blunt postprandial endothelial dysfunction. Furthermore, these results also show that this effect is dependent on L-arginine status before treatment. The simple baseline fasting level of arginine may reflect the organization of arginine metabolism that determines the dynamic changes that affect the arginine-NO pathway during acute endothelial dysfunction.

Acknowledgments

We appreciate the very important contribution of Marie-Claude Amard to the organization of the experimental sessions at the Clinical Research Center and her crucial practical help, as well as that of Gheorghe Airinei. We also thank Abdel Boukaidi for carrying out the ultrasound scans and Caroline Leroy for her assistance with biochemical analyses. We also appreciate the expert contributions of Nadine Mézière and Colette Mustière (UMR 1348 PEGASE) regarding amino acid analysis. FM designed the research; AD, IP, SGW, EA, FL-A, PB, SS, DH, HF, J-FH, RB, and FM contributed to implementing the research; AD and FM conducted the research; AD, IP, SS, VM, HF, J-FH, and FM analyzed the data; AD and FM wrote the paper and had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

References

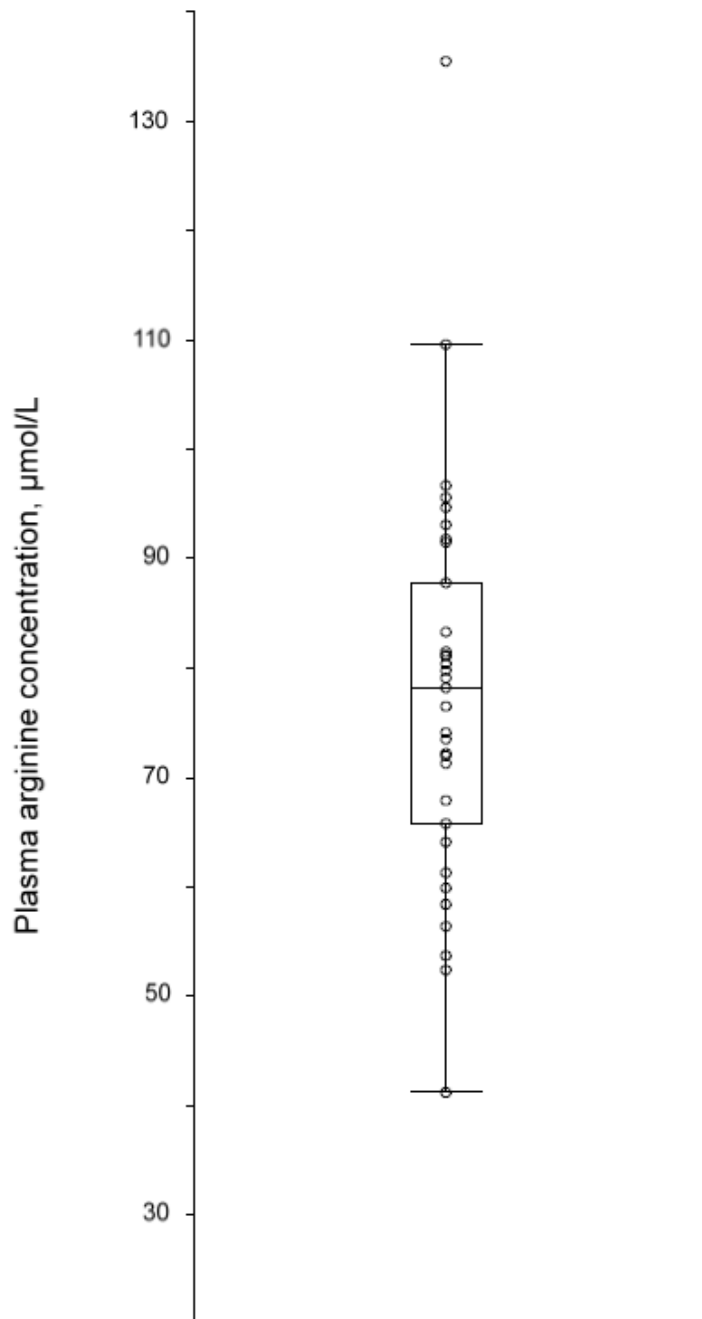
- Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15:265–79.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888–904.
- Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 2003;3:279–88.
- Siervo M, Jackson SJ, Bluck LJ. In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method. *J Hypertens* 2011;29:1515–27.
- Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006;4:53–65.
- Siekmeier R, Grammer T, März W. Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13:279–97.
- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147(Suppl 1):S193–201.
- Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:4–18.
- Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 2002;162:1–15.
- Bode-Böger SM. Effect of L-arginine supplementation on NO production in man. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:91–9.
- Bai Y, Sun L, Yang T, Sun K, Chen J, Hui R. Increase in fasting vascular endothelial function after short-term oral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2009;89:77–84.
- Böger G, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2274–82.
- Maxwell AJ, Zapien MP, Pearce GL, MacCallum G, Stone PH. Randomized trial of a medical food for the dietary management of chronic, stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:37–45.
- Siasos G, Tousoulis D, Vlachopoulos C, Antoniadis C, Stefanadi E, Ioakeimidis N, Andreou I, Zisimos K, Papavassiliou AG, Stefanadis C. Short-term treatment with L-arginine prevents the smoking-induced impairment of endothelial function and vascular elastic properties in young individuals. *Int J Cardiol* 2008;126:394–9.
- Mah E, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *Nutr Res* 2012;32:727–40.
- Mah E, Noh SK, Ballard KD, Matos ME, Volek JS, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine:arginine. *J Nutr* 2011;141:1961–8.
- Magné J, Huneau JF, Delemasure S, Rochette L, Tomé D, Mariotti F. Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats. *Nitric Oxide* 2009;21:37–43.
- Lefèbvre PJ, Scheen AJ. The postprandial state and risk of cardiovascular disease. *Diabet Med* 1998;15(Suppl 4):S63–8.
- Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Esposito K, Giugliano D. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes* 2004;53:701–10.
- Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002;106:1211–8.
- Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, Jimenez JJ, Mauro LM, Chirinos JA, Ghany R, Virani S, Garcia S, Horstman LL, et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation* 2004;110:3599–603.
- Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R, Giugliano D. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1145–50.
- Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997;79:350–4.
- Neri S, Signorelli SS, Torrisi B, Pulvirenti D, Mauceri B, Abate G, Ignaccolo L, Bordonaro F, Cilio D, Calvagno S, et al. Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. *Clin Ther* 2005;27:1764–73.
- Lin CC, Tsai WC, Chen JY, Li YH, Lin LJ, Chen JH. Supplements of L-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress. *Int J Cardiol* 2008;127:337–41.
- Borucki K, Aronica S, Starke I, Luley C, Westphal S. Addition of 2.5 g L-arginine in a fatty meal prevents the lipemia-induced endothelial dysfunction in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2009;205:251–4.
- Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Roscini AR, Vaudo G, Sinzinger H, Mannarino E. Oral L-arginine administration attenuates postprandial endothelial dysfunction in young healthy males. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:343–9.
- Westphal S, Taneva E, Kastner S, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger S, Kropf S, Dierkes J, Luley C. Endothelial dysfunction induced by postprandial lipemia is neutralized by addition of proteins to the fatty meal. *Atherosclerosis* 2006;185:313–9.

29. Deveaux A, Fouillet H, Petzke KJ, Hermier D, André E, Bunouf P, Lantoin-Adam F, Benamouzig R, Mathé V, Huneau J-F, Mariotti F. A slow compared with a fast release form of oral arginine increases its utilization for NO synthesis in overweight adults with cardiometabolic risk factors in a randomized controlled study. *J Nutr*. In press.
30. McCrea CE, Skulas-Ray AC, Chow M, West SG. Test-retest reliability of pulse amplitude tonometry measures of vascular endothelial function: implications for clinical trial design. *Vasc Med* 2012;17:29–36.
31. Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr* 1986;116:36–46.
32. Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, Galluzzo A. AlkaMeSy Study Group. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 2010;33:920–2.
33. Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL, Lemosquet S. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *J Dairy Sci* 2012;95:5876–87.
34. International Physical Activity Questionnaire website. Guidelines for the data processing and analysis of the International Physical Activity Questionnaire. November 2005 [Internet]. [cited 2016 May 2]. Available from: <https://sites.google.com/site/theipaq/scoring-protocol>.
35. West SG, Wagner P, Schoemer SL, Hecker KD, Hurston KL, Likos Krick A, Boseska L, Ulbrecht J, Hinderliter AL. Biological correlates of day-to-day variation in flow-mediated dilation in individuals with type 2 diabetes: a study of test-retest reliability. *Diabetologia* 2004;47:1625–31.
36. West SG, Hecker KD, Mustad VA, Nicholson S, Schoemer SL, Wagner P, Hinderliter AL, Ulbrecht J, Ruey P, Kris-Etherton PM. Acute effects of monounsaturated fatty acids with and without omega-3 fatty acids on vascular reactivity in individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005;48:113–22.
37. Gemignani V, Bianchini E, Fatta F, Giannarelli C, Plantinga Y, Ghiadoni L, Demi M. Ultrasound measurement of the brachial artery flow-mediated dilation without ECG gating. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:385–91.
38. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137–41.
39. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467–74.
40. Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:6–11.
41. Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft JR, Newby DE, Webb DJ. The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. *J Physiol* 2000;525:263–70.
42. Chowienzyk PJ, Kelly RP, MacCallum H, Millasseau SC, Andersson TL, Gosling RG, Ritter JM, Anggard EE. Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2007–14.
43. Hall WL, Sanders KA, Sanders TA, Chowienzyk PJ. A high-fat meal enriched with eicosapentaenoic acid reduces postprandial arterial stiffness measured by digital volume pulse analysis in healthy men. *J Nutr* 2008;138:287–91.
44. Ayer JG, Harmer JA, Steinbeck K, Celermajor DS. Postprandial vascular reactivity in obese and normal weight young adults. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:945–51.
45. Pfeuffer M, Fielitz K, Laue C, Winkler P, Rubin D, Helwig U, Giller K, Kammann J, Schwedhelm E, Böger RH, et al. CLA does not impair endothelial function and decreases body weight as compared with safflower oil in overweight and obese male subjects. *J Am Coll Nutr* 2011;30:19–28.
46. Herieka M, Erridge C. High-fat meal induced postprandial inflammation. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:136–46.
47. van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HW, De Jaegere PP, Cabezas MC. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2004;177:175–82.
48. Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? *Br J Nutr* 2005;93:3–9.
49. Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasan RS, Keaney JF, Jr., Lehman BT, Fan S, Osypiuk E, Vita JA. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;109:613–9.
50. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, Nubret E, Sarfati G, Bergheim I, De Bandt JP. Citrulline and nonessential amino acids prevent fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *J Nutr* 2015;145:2273–9.
51. Breuillard C, Belabed L, Bonhomme S, Blanc-Quentin MC, Neveux N, Couderc R, De Bandt JP, Cynober L, Darquy S. Arginine availability modulates arginine metabolism and TNFalpha production in peritoneal macrophages from Zucker diabetic fatty rats. *Clin Nutr* 2012;31:415–21.
52. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Sweeters N, Simon J, Vichinsky EP, Styles LA. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2000;111:498–500.
53. Luiking YC, Poeze M, Deutz NE. Arginine infusion in patients with septic shock increases nitric oxide production without haemodynamic instability. *Clin Sci (Lond)* 2015;128:57–67.
54. Mariotti F, Petzke KJ, Bonnet D, Szezepanski I, Bos C, Huneau JF, Fouillet H. Kinetics of the utilization of dietary arginine for nitric oxide and urea synthesis: insight into the arginine-nitric oxide metabolic system in humans. *Am J Clin Nutr* 2013;97:972–9.
55. Avogaro A, Toffolo G, Kiwanuka E, de Kreutzenberg SV, Tessari P, Cobelli C. L-Arginine-nitric oxide kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: a stable-labelled ¹⁵N arginine approach. *Diabetes* 2003;52:795–802.
56. Castillo L, deRoja TC, Chapman TE, Vogt J, Burke JF, Tannenbaum SR, Young VR. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:193–7.
57. Ball RO, Urschel KL, Pencharz PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *J Nutr* 2007;137(6 Suppl 2):1626S–41S.
58. van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr* 2004;79:185–97.

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Figure 1

Distribution of plasma arginine concentration at baseline



Supplemental Figure 1. Distribution of plasma arginine concentration at baseline in adults with the hypertriglyceridemic waist phenotype ($n=33$). The distribution is presented by a box and whiskers plot showing the median (middle bar), inter-quartile space (white box), the first and the last decile (end of whiskers), and the plasma arginine concentration for each subject is presented by scatter plot ($\circ$).

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Method 1

Non-inclusion criteria of the study population

The non-inclusion criteria included obesity (BMI >30); cardiac or vascular disease; diabetes; thyroid disease; systolic blood pressure >150 mmHg or diastolic blood pressure >90 mmHg; tobacco consumption >6 cigarettes per week; alcohol consumption >2 drinks per day; any medications (except contraceptive treatment) or intake of dietary supplements that could not be discontinued more than one week before the first visit and then for the entire duration of the study; persons under guardianship; positive for hepatitis B virus, hepatitis C virus and HIV; hemoglobin <14 g/dL for men or <12 g/dL for women; participation in a clinical trial during the 6 months prior to the study; pregnant (positive beta-hCG blood test) and lactating women, and in women, a menstrual cycle with a duration differing from 28 ($\pm$ 1) days (with or without contraceptive treatment); subjects with allergies to ingredients in the final product or in the high-fat meal; subjects with contraindications to arginine intake, namely those with asthma, prone to herpes or suffering from liver cirrhosis or renal failure; and finally, hypotensive patients in whom the use of glyceryl trinitrate (GTN) is contraindicated.

Recruitment of participants

The subjects were recruited between October 2013 and January 2014, by the Human Research Center at Avicenne Hospital (CRNH Ile-de-France Human Research Center) using the methods usually employed, *i.e.* posters, word-of-mouth, mailing list or electronic posting on internet social networks. Those interested were then interviewed in order to present all the details of the study, after which they were asked a series of medical and lifestyle questions. Eighty-seven people met the study criteria and were scheduled for clinical screening by the Human Research Center. After obtaining their written informed consent, a screening blood sample was drawn. Body weight, height and WC were measured, and the BMI calculated. Among the 87 persons who were assessed, 28 did not meet the inclusion criteria (particularly regarding elevated fasting TGs), 16 refused to participate in the study, 6 were lost from sight and one volunteer was allergic to milk. Finally, 36 subjects confirmed their willingness to participate and were found to be eligible to participate in the study. The study was approved by the Institutional Review Board of Saint-Germain-en-Laye Hospital, authorized by the French Ministry for Health and carried out between February 2014 and May 2014.

Randomization scheme

At enrollment, the participants were assigned to a pre-determined randomized sequence number. Each sequence specified an order of administration of SR-arginine and Placebo. The randomization scheme consisted of successive blocks so that each block contains four assignments of sequences in random order, the randomization scheme thus being balanced at the completion of each block. The randomization list was produced by the Clinical Department at Pierre Fabre Médicament (Toulouse, France) using internally certified software. Using another test list, a Pierre Fabre statistician checked that the randomization scheme parameters were properly specified in the software and finally approved the randomization method. The definitive randomization list was then issued.

DISCUSSION GENERALE

Notre travail, par l'intermédiaire de deux études cliniques, a mis en évidence, d'une part, que l'arginine orale sous une forme à libération prolongée (LP), mimant la mise à disposition naturelle de l'arginine alimentaire, est davantage utilisée pour la synthèse de NO que l'arginine sous une forme à libération immédiate (LI), et davantage chez les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique; et d'autre part, qu'une supplémentation de type nutritionnel en arginine (faible dose et forme lente) améliore la fonction endothéliale postprandiale chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique mais que cet effet n'est patent que chez les sujets présentant une argininémie basale relativement plus faible.

Intérêt d'une supplémentation nutritionnelle en arginine

Une des découvertes majeures de notre travail a été de mettre en évidence l'intérêt d'une supplémentation en arginine de type nutritionnel, c-à-d. à faible dose et lentement mise à disposition, pour l'amélioration de la santé vasculaire. En effet, avec notre première étude nous avons montré que l'utilisation de l'arginine orale, pour la synthèse de NO, est plus élevée lorsque l'arginine orale est absorbée et mise à disposition lentement. Ces résultats sont confirmés par une augmentation des concentrations en citrulline plasmatique, provenant directement de l'arginine orale marquée, après la consommation de l'arginine-LP par rapport à l'arginine-LI (Annexe 1, Figure 1). Les données pharmacocinétiques que nous avons recueillies au cours de notre première étude clinique ont montré que, pour les formes LI et LP d'arginine, environ la moitié de l'arginine orale était hydrolysée en urée, et que ce phénomène avait lieu de façon précoce lors de l'extraction de premier passage au niveau splanchnique. La fraction de l'arginine orale qui était convertie en urée était d'environ 60% avec la forme LI, ce qui est cohérent avec des résultats antérieurs obtenus par notre équipe, qui ont montré que quelle que soit la quantité ingérée d'arginine alimentaire, 60 % étaient convertis en urée (196). Malgré cette extraction très importante, l'arginine orale que nous avons administrée à nos volontaires, a majoritairement contribué à l'augmentation de l'arginine plasmatique sur 24 h. Ainsi nous avons montré qu'une supplémentation en arginine, qui consiste – approximativement - à doubler l'apport moyen en arginine chez l'Homme adulte, a entraîné une augmentation importante des concentrations totales d'arginine plasmatique. Les données pharmacocinétiques ont également mis en avant que la cinétique de l'arginine orale dans le

plasma, tracée avec l'arginine ^{15}N , différait nettement entre les formes LI et LP. Comme attendu, la forme LP est apparue plus tardivement dans le plasma, avec une mise à disposition couvrant environ 8 h, ce qui était cohérent avec une libération mimant celle de l'arginine contenue dans les protéines alimentaires (290). Les profils cinétiques de l'arginine plasmatique totale étaient également nettement différents entre les formes LI et LP, avec un profil beaucoup plus étalé pour la forme LP. Cependant, nous avons également constaté que l'arginine plasmatique circulante était globalement similaire quelle que soit la forme utilisée, alors que la concentration en arginine orale retrouvée dans la circulation systémique était inférieure après la consommation de la forme LP, comparativement à la forme LI. Une telle absence de différence dans les concentrations d'arginine plasmatique circulante, après supplémentation, peut provenir de différences dans les taux d'apparition et/ou d'élimination de l'arginine plasmatique. En plus de l'arginine orale dans sa forme intacte (marquée au ^{15}N ici), il y a d'autres contributeurs à l'arginine plasmatique pendant la période postprandiale, y compris l'arginine orale recyclée (c.-à-d. l'arginine orale qui a perdu son groupe guanidium d'origine), ainsi que l'arginine provenant des protéines alimentaires, l'arginine synthétisée à partir d'autres acides aminés alimentaires, et, enfin, l'arginine synthétisée de manière endogène; et les voies d'utilisation de l'arginine plasmatique comprennent son hydrolyse et la synthèse des protéines, de la créatine, de l'agmatine et du NO. La biodisponibilité en arginine plasmatique est principalement régulée par sa dégradation (231, 253, 355) et parallèlement, les cinétiques de l'ornithine plasmatique présentaient des profils similaires avec ceux de l'arginine plasmatique. Ceci peut facilement être expliqué par la principale voie d'utilisation de l'arginine orale qui est l'hydrolyse par la voie arginase (avec la formation d'ornithine), et qui est connue pour avoir lieu principalement lors de l'extraction de premier passage de l'arginine (196). De ce fait, l'arginine plasmatique peut également provenir du recyclage de l'ornithine issue de cette hydrolyse de premier passage (196, 292, 368), ce qui pourrait avoir contribué à lisser la cinétique de l'arginine plasmatique sur 24 h. Le fait qu'une moins grande concentration de la forme LP soit retrouvée dans la circulation systémique par rapport à la forme LI indique que la conversion plus élevée de NO avec la forme LP ne peut pas être attribuée à une différence au niveau des concentrations circulantes en arginine, mais plutôt à un effet spécifique du profil cinétique de mise à disposition de l'arginine avec la forme LP. Il existe différentes explications pour cet effet spécifique de l'arginine LP. Une hypothèse qui cadrerait avec la compartimentation importante, complexe et bien connue du métabolisme de l'arginine (196), serait que l'arginine mise à disposition lentement pourrait être plus efficace pour atteindre les compartiments éloignés où la NO synthase opère. Une telle hypothèse est

également soutenue par notre constatation d'une différence retardée sur l'excrétion des nitrates marqués avec la forme LP par rapport à la forme LI. Une cinétique lente pourrait également limiter l'activation de l'élimination métabolique de l'arginine, favorisant ainsi d'autres voies d'utilisation, y compris la synthèse de NO (22, 24, 25, 98, 196). En effet, une étude a montré, que comparativement à une alimentation continue, un repas sous forme de bolus induisait un influx plus brusque d'absorption, connu pour stimuler l'extraction splanchnique des acides aminés azotés alimentaires à travers leur orientation préférentielle vers les voies d'élimination oxydantes (366). Dans ce sens, nous avons pu observer que l'arginine-LP était un peu moins dirigée (environ 10%) vers la voie de synthèse de l'urée (Annexe 1, Figure 2), et donc qu'une moindre compétition de la voie NO synthase avec la voie arginase pourrait expliquer, en partie, l'utilisation plus élevée de la forme lente par rapport à la forme libre d'arginine pour la synthèse de NO. Ainsi, notre première étude a mis en évidence qu'une supplémentation avec de l'arginine lentement mise à disposition semble particulièrement efficace pour augmenter la synthèse de NO, notamment dans des conditions où cette synthèse est altérée. Cette augmentation de la synthèse de NO avec l'arginine-LP, s'est traduite physiologiquement par une amélioration de la fonction endothéliale en période postprandiale, période impliquant une altération transitoire de la synthèse de NO, au cours de notre deuxième étude.

Bénéfice de la supplémentation nutritionnelle en arginine, particulièrement dans un contexte où la synthèse de NO est amoindrie

Comme nous l'avons vu précédemment, bien que les concentrations d'arginine ne soient pas limitantes au regard du K_m de la NO synthase pour l'arginine, il a été montré qu'une diminution en arginine circulante ou des supplémentations orales en arginine modulaient les fonctions physiologiques liées au NO (3, 13, 24, 25, 96, 285, 303, 306-308). Chez les sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique, une réduction de la synthèse totale de NO est observée (4, 9, 17, 364) et au cours de notre première étude clinique, nous avons montré une plus grande utilisation de l'arginine orale pour la synthèse de NO chez les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Ainsi, nous avons supposé que dans un contexte de risque cardiométabolique, la synthèse de NO est plus faible mais aussi plus sensible à un apport exogène d'arginine. Cette hypothèse expliquerait aussi pourquoi les résultats positifs concernant les bénéfices d'une supplémentation en arginine ont surtout été démontrés chez des patients qui présentent une maladie cardiovasculaire ou des facteurs de risque cardiovasculaire. Cette régulation à la hausse de l'utilisation de l'arginine exogène soutient l'idée qu'une diminution de la synthèse de NO, dans

un contexte de risque cardiovasculaire, résulte de l'activation d'une voie compétitive (par exemple, la voie arginase), ou d'une inhibition compétitive (avec un inhibiteur endogène tel que l'ADMA), qui peuvent être surmontées en augmentant l'apport en arginine. En revanche, chez les sujets sains, la synthèse de NO résulterait d'une régulation très fine, qui serait donc peu sensible aux variations de la consommation standard en arginine alimentaire à laquelle ils sont naturellement confrontés (11, 40). Dans notre première étude, nous ne pouvons pas attribuer la différence d'utilisation de l'arginine entre les sujets sains et les sujets à risque, à une différence de biodisponibilité en arginine plasmatique, qui se traduit par l'argininémie basale ou les ratios prenant en compte les produits du métabolisme de l'arginine, notamment le GABR. En effet, l'argininémie basale et la biodisponibilité globale en arginine ne différaient pas entre les sujets sains à risque et les sujets sains témoins, comme cela a pu être rapporté dans d'autres conditions (par exemple (308)). Cependant il faut noter que le GABR ne tient pas compte de la compartimentation du métabolisme de l'arginine, et ainsi nous ne pouvons pas exclure un effet dû à une variation de la biodisponibilité en arginine entre les sujets sains témoins et les sujets sains à risque (306). Parallèlement, de nombreux mécanismes pour une inhibition compétitive de la synthèse de NO ont été proposés, y compris des modifications de la compartimentation du métabolisme de l'arginine, une compétition avec l'activité de l'arginase ou une augmentation des inhibiteurs compétitifs directs de la NO synthase comme l'ADMA (54, 191, 208, 294, 296-298). Dans notre première étude, l'ADMA ne semble pas impliquée car les concentrations d'ADMA plasmatiques ne différaient pas entre les sujets sains témoins et les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiometabolique. Cependant, parce que la compartimentation intracellulaire de l'ADMA et de l'arginine est extrêmement complexe, un rôle de l'ADMA dans l'inhibition compétitive de la synthèse de NO chez nos sujets sains présentant des facteurs risque ne peut pas être complètement écarté. Enfin, nos données ne semblent pas indiquer une plus forte hydrolyse de l'arginine chez les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiometabolique (Annexe 1, Figure 2). Ainsi, d'après les données obtenues lors de cette première étude, il est impossible de déterminer le mécanisme impliqué pour expliquer la meilleure utilisation de l'arginine orale pour la synthèse de NO chez les sujets sains présentant des facteurs de risque cardiometabolique.

Dans notre deuxième étude, notre principale découverte est que la supplémentation en arginine-LP atténue la dysfonction endothéliale postprandiale quand les sujets présentent une argininémie basale relativement plus faible. Dans l'échantillon complet de notre deuxième étude, la supplémentation en arginine-LP a atténué la dysfonction endothéliale postprandiale, mais cet effet n'a pas été confirmé par une valeur significativement plus élevée de la FMD à la

fin de la période postprandiale. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité qu'un tel effet de l'arginine-LP sur la diminution postprandiale de la FMD puisse être lié à la valeur plus élevée de la FMD à jeun avec le placebo. Le fait que la FMD ait augmenté avec le placebo et non avec l'arginine-LP était cependant inattendu. Néanmoins, l'atténuation de la diminution postprandiale de la FMD avec la supplémentation en arginine est compatible avec des résultats antérieurs retrouvés dans la littérature, même si les études de supplémentation ont été effectuées avec différentes doses d'arginine et dans différentes conditions (principalement chez des sujets sains). Ces études ont montré qu'une supplémentation aiguë en arginine atténuait les effets d'un repas hyperlipidique sur la fonction endothéliale de sujets sains (179, 263). Bai *et al.*, eux, ont montré que l'arginine orale améliorait la fonction endothéliale à jeun lorsque la FMD basale était faible (30). Une diminution d'environ 38% de la FMD, 4 h après le repas de charge, a été constatée au cours de notre deuxième étude, ce qui est comparable aux différences de FMD attribuées à la présence de facteurs de risque chez les sujets sains, ou à une différence entre les sujets sains présentant des facteurs de risque et les patients avec une maladie cardiovasculaire ou un diabète de type 2 (30, 387). Une diminution de la FMD en postprandial, tout comme une faible FMD basale, pourrait donc résulter d'une diminution de la synthèse de NO, qui pourrait être réversible avec une supplémentation en L-arginine (30). Ainsi, une explication de nos résultats qui justifierait l'absence d'effets de la supplémentation en arginine-LP sur la fonction endothéliale à jeun pourrait être que nos sujets sains, malgré la présence de facteurs de risque cardiométabolique, ne présentaient pas d'altération de leur fonction endothéliale à l'état basal. Pourtant, Böger *et al.* ont rapporté qu'une supplémentation en arginine orale à libération prolongée améliorait la fonction endothéliale à jeun chez des sujets sains avec des facteurs de risque cardiovasculaire (245). La différence entre nos résultats et les résultats de Böger et coll. peut s'expliquer par la différence des populations étudiées. Les sujets dans l'étude de Böger étaient plus âgés que les nôtres, et ils étaient pour la plupart hypercholestérolémiques, obèses ou fumeurs, tandis que nos sujets ont été choisis pour présenter un tour de taille hypertriglycéridémique et un surpoids, mais il ne s'agissait pas d'obèses, ni de fumeurs. Ainsi, dans l'étude de Böger et coll., les sujets présentent des facteurs de risque cardiovasculaire majeurs dont l'hypercholestérolémie. Or, comme nous avons vu au cours de l'introduction bibliographique, de nombreuses études de supplémentation en arginine orale ont rapporté une amélioration de la fonction endothéliale chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie, qui est connue pour être associée à des concentrations élevées en ADMA (233). Récemment, il est devenu plutôt évident que les niveaux endogènes d'ADMA peuvent déterminer la réponse d'un sujet à une supplémentation

en arginine (245). Ainsi, une autre explication de notre absence d'effets de la supplémentation en arginine-LP sur la fonction endothéliale à jeun pourrait être que nos sujets sains ne présentaient pas de niveaux élevés en ADMA.

En revanche, cette étude est la première à montrer que l'effet vasculaire de la supplémentation en L-arginine dépend du statut sous-jacent en arginine, contrairement aux résultats obtenus lors de la première étude. Ainsi, alors que des résultats mitigés ont été observés au sein de l'ensemble de nos sujets sains présentant des facteurs de risque, les résultats étaient très nets chez les sujets ayant une argininémie basale relativement plus faible : chez ces sujets, la supplémentation en arginine-LP atténuait clairement la dysfonction endothéliale postprandiale, avec des valeurs de FMD et de fRHI significativement plus élevées en fin de période postprandiale, comparativement au placebo. L'hypothèse que l'effet de la supplémentation en arginine dépende du statut d'argininémie basale ne peut être émise qu'à partir de données parcellaires de la littérature. Certaines études ont montré que l'augmentation de la biodisponibilité en arginine pourrait rétablir la synthèse de NO cellulaire et ainsi contribuer à la régulation du processus inflammatoire en situation de faible argininémie (chez des rats obèses diabétiques ou chez des rats nourris au fructose), qui refléterait un métabolisme de l'arginine altéré (388, 389). De même, une étude a rapporté une amélioration de la synthèse de NO après une supplémentation en arginine chez des patients atteints de la drépanocytose, en période de crise vaso-occlusive, où l'argininémie basale est faible (46 $\mu\text{mol/L}$), et qui caractérise une « déficience » en arginine dans d'autres conditions cliniques (308, 390). La raison pour laquelle la supplémentation en arginine a des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale lorsque les sujets sains ont une faible argininémie basale reste spéculative. Une raison possible pourrait être que chez ces sujets, l'arginine orale compenserait la plus faible biodisponibilité basale de l'arginine endogène pour la synthèse de NO, et cet effet primordial serait apparent et efficace lors d'une situation où la voie arginine-NO est « challengée », comme lors de la phase postprandiale (300-302, 376). Toutefois, la concentration en arginine dans la circulation systémique reflète mal son utilisation, parce que ce compartiment n'est pas un précurseur direct pour la synthèse de NO (88, 196). Il n'existe donc pas de relation simple entre la concentration d'arginine plasmatique et la synthèse de NO, que ce soit lors de la phase postprandiale ou à jeun. Néanmoins, les concentrations d'arginine basales seraient principalement régulées par la dégradation de l'arginine (183, 212, 391). Ainsi, les concentrations basales en arginine pourraient refléter la configuration métabolique sous-jacente du métabolisme de l'arginine (c-à-d. l'équilibre entre la synthèse *de novo*, l'apport alimentaire et la dégradation de l'arginine) et ainsi la capacité de mobilisation

de l'arginine pour soutenir la synthèse de NO, dans une situation dynamique où celle-ci est compromise. Etant donné que nous avons étudié la même population cible au cours de nos deux études et au vu des résultats obtenus avec la deuxième étude clinique, nous pouvons imaginer que le mécanisme à l'origine de la différence d'utilisation de l'arginine pour la synthèse de NO entre les sujets sains et les sujets à risque de notre première étude, pourrait être dû à une moindre capacité d'orientation de l'arginine vers la synthèse de NO. Ainsi, les résultats combinés de nos deux études semblent indiquer qu'une supplémentation nutritionnelle en arginine est particulièrement efficace lorsque la synthèse de NO est amoindrie, que ce soit une diminution aiguë ou chronique, mais aussi que la « biodisponibilité » basale en arginine pourrait être un bon marqueur de la moindre capacité du métabolisme à orienter l'arginine endogène vers la synthèse de NO, et qu'elle permettrait d'identifier les individus susceptibles de répondre favorablement à une supplémentation en arginine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, dans un premier temps, nous avons montré que l'arginine orale, particulièrement sous une forme à libération prolongée, est utilisée plus efficacement pour la synthèse de NO quand les sujets sains présentent des facteurs de risque cardiométabolique. Ce résultat nous semble particulièrement intéressant dans une perspective de recherche clinique et d'études plus mécanistiques pour étudier dans quelle mesure et par quel mécanisme l'arginine alimentaire, lentement mise à disposition, améliore la synthèse de NO, et ainsi la fonction endothéliale, chez des sujets présentant des facteurs de risque cardiovasculaire ou des maladies cardiovasculaires. Nos résultats soutiennent également l'idée que la diminution de la synthèse de NO lors d'un syndrome métabolique résulterait d'une inhibition compétitive. Ainsi dans un tel contexte, un apport plus élevé en substrat pourrait alimenter la voie de synthèse du NO. Enfin, nous avons montré que la cinétique de mise à disposition de l'arginine est un facteur déterminant pour son orientation vers la synthèse de NO chez les sujets à risque cardiométabolique, avec une orientation plus importante vers la synthèse de NO lorsque l'arginine est absorbée lentement, comme cela arrive naturellement avec l'arginine de l'alimentation courante. Ce résultat original, en lien avec les preuves de plus en plus évidentes que le contenu en arginine des protéines alimentaires peut expliquer leurs effets bénéfiques sur la fonction endothéliale, met en évidence l'importance de réaliser d'autres études soigneusement contrôlées avec de faibles doses d'arginine lentement mise à disposition.

Dans un deuxième temps, nous avons montré qu'une supplémentation nutritionnelle en arginine (dose faible et forme lente) atténue la dysfonction endothéliale postprandiale lorsque l'argininémie basale est relativement faible. La supplémentation en arginine-LP n'a pas amélioré la fonction endothéliale à jeun, mais confirmant en cela le principe que les suppléments en arginine sont bénéfiques lorsque la fonction vasculaire est altérée, la supplémentation avec l'arginine-LP a en fait atténué la dysfonction endothéliale postprandiale. En outre, nos résultats montrent également que cet effet dépend de l'argininémie basale avant l'administration du traitement, et plus précisément que la supplémentation en arginine-LP atténue la dysfonction endothéliale postprandiale lorsque les concentrations en arginine circulante sont relativement plus faibles. De manière simple, l'argininémie basale pourrait refléter l'organisation sous-jacente complexe du métabolisme de l'arginine, qui déterminerait la biodisponibilité en arginine pour la synthèse de NO dans une

situation de dysfonction endothéliale aiguë, c-à-d. où la fonction endothéliale est transitoirement altérée.

Pris ensemble, les résultats de ce travail suggèrent qu'il existe des sous-groupes d'individus dont la fonction vasculaire est améliorée par une supplémentation nutritionnelle en arginine, et que tous les sujets ne profiteraient pas d'une telle intervention nutritionnelle. Nos résultats rejoignent l'essentiel du corpus scientifique qui montre que les effets bénéfiques d'une supplémentation en arginine sont principalement obtenus en situation de risque ou de maladie. Des marqueurs d'état métabolique sont nécessaires pour permettre l'identification prospective des individus qui auraient une probabilité plus importante de répondre favorablement à une supplémentation en arginine. Il semblerait, dans notre cas, que la présence de facteurs de risque cardiométabolique ou une argininémie basale relativement plus faible, caractérisent les sujets susceptibles de bien répondre à une supplémentation nutritionnelle en arginine. Cette hypothèse reste à confirmer par d'autres études dans différentes conditions d'altération de la fonction endothéliale. Les résultats que nous avons obtenus avec la forme lente d'arginine, et qui cadrent avec la compartimentation du métabolisme de l'arginine (196), sont que l'arginine mise à disposition lentement pourrait être plus efficace pour atteindre les compartiments éloignés où la NO synthase opère. En outre, une cinétique lente semble limiter l'activation de l'élimination métabolique de l'arginine, favorisant ainsi d'autres voies d'utilisation, y compris la synthèse de NO (22, 24, 25, 98, 196). Enfin, l'utilisation plus élevée de l'arginine orale, que nous avons observée chez les sujets sains présentant des facteurs de risque, soutient l'idée qu'une diminution de la synthèse de NO résulte de l'activation d'une voie compétitive, la voie arginase, ou d'une inhibition compétitive, qui peuvent être surmontées en augmentant l'apport en arginine. Ainsi, il pourrait donc être intéressant de tester l'effet d'une supplémentation en arginine-LP, chez des sujets avec des concentrations élevées en ADMA, qui seraient susceptibles de répondre favorablement à une supplémentation nutritionnelle en arginine. Une étude de Böger *et al.* réalisée avec de l'arginine-LP semble aller dans ce sens-là (245). Mais au vu de notre deuxième étude, et avec les quelques nouveaux éléments que l'on trouve dans la littérature, il serait également intéressant d'étudier les effets d'une supplémentation nutritionnelle chez des sujets présentant des concentrations relativement faibles en arginine circulante, qui reflèteraient chez eux une capacité moindre de leur métabolisme à orienter l'arginine vers la synthèse de NO. Ce type d'étude, couplé à d'autres études avec un éventail plus large de conditions, permettrait également de déterminer la valeur pronostique des niveaux

d'argininémie basale ou bien du GABR, comme biomarqueurs de la réponse des individus aux suppléments en arginine.

Enfin, de façon très intéressante, notre travail a mis en évidence que l'arginine, à dose et à forme nutritionnelles, semble plutôt être favorable pour la fonction vasculaire dans un contexte de stress métabolique et physiologique, où la fonction endothéliale est transitoirement altérée. La dérégulation métabolique observée au cours de la phase postprandiale semble en effet plus propice à la manifestation d'un effet bénéfique de l'arginine sur la fonction endothéliale vasculaire. Nous avons vu que la dysfonction endothéliale postprandiale se caractérise notamment par des phénomènes délétères de stress oxydant (170, 171), et de manière plus générale que le stress oxydant joue un rôle dans la physiopathologie du syndrome métabolique (126). L'utilisation d'autres marqueurs de la dysfonction endothéliale, comme la production de ROS, serait nécessaire pour mieux appréhender l'impact de l'arginine-LP sur la fonction endothéliale vasculaire et les mécanismes sous-jacents. Enfin, une importante littérature met en avant l'impact des acides aminés soufrés sur la fonction endothéliale. Des travaux ont notamment montré que l'altération de l'homéostasie du glutathion était associée à une dysfonction endothéliale chez le sujet sain, et ont fait émerger l'intérêt de la cystéine, précurseur naturel du glutathion, comme possible modulateur de la fonction endothéliale (392). Au cours de ces dernières années, une étude réalisée au sein de notre équipe avait montré qu'une supplémentation, chez le rat, en protéines de colza riches en arginine et en cystéine, ou une supplémentation en arginine + cystéine, restaurait la fonction endothéliale postprandiale ou atténuait significativement la dysfonction endothéliale postprandiale, respectivement (171). Ces effets étaient notamment associés à une diminution du stress oxydant (171). Ainsi, de manière générale, il serait intéressant de tester l'effet d'une supplémentation nutritionnelle combinée en arginine et en antioxydants sur la fonction endothéliale et de voir si cette combinaison pourrait avoir des effets synergiques en agissant sur différents paramètres de la dysfonction endothéliale. A titre d'exemple, il pourrait être intéressant de combiner l'arginine-LP avec de la cystéine, et d'évaluer leurs effets sur la fonction endothéliale, à jeun et en postprandial, chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique.

En conclusion, ces résultats de modulation de la synthèse de NO et de la fonction endothéliale postprandiale par une supplémentation nutritionnelle en arginine, dans un contexte où le métabolisme ne serait pas en mesure d'orienter l'arginine endogène vers la

synthèse de NO lorsque celle-ci est altérée, recèle un intérêt en termes de nutrition préventive. Ainsi, il convient d'envisager l'arginine à dose alimentaire et sous une forme lentement mise à disposition comme une véritable stratégie nutritionnelle de prévention de désordres métaboliques associés à un risque cardiovasculaire et diabétique élevé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995;9(13):1319-30.
2. Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Jr., Darley-Usmar VM. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem* 2010;285(26):19699-704. doi: 10.1074/jbc.R110.101618.
3. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S193-201. doi: 10.1038/sj.bjp.0706458.
4. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15(4):265-79. doi: 10.1016/j.niox.2006.03.011.
5. Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR. Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 2002;105(2):213-7.
6. Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004;109(15):1819-22. doi: 10.1161/01.CIR.0000126837.88743.DD.
7. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, Natali A, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005;23(2):233-46.
8. Chan NN, Colhoun HM, Vallance P. Cardiovascular risk factors as determinants of endothelium-dependent and endothelium-independent vascular reactivity in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(7):1814-20.
9. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113(15):1888-904. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213.
10. Steinberg HO, Baron AD. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 2002;45(5):623-34. doi: 10.1007/s00125-002-0800-2.
11. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97(11):2601-10. doi: 10.1172/JCI118709.
12. Maxwell AJ. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide* 2002;6(2):101-24. doi: 10.1006/niox.2001.0394.
13. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10(1):4-18.
14. Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Tanus-Santos JE. Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2008;19(4):345-50. doi: 10.1016/j.niox.2008.08.005.
15. Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, Li H, Benndorf R, Luneburg N, Förstermann U, Böger RH. Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2008;54(2):292-300. doi: 10.1373/clinchem.2007.093575.

16. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13(1):97-104. doi: 10.1097/MCO.0b013e328332f99d.
17. Siervo M, Jackson SJ, Bluck LJ. In-vivo nitric oxide synthesis is reduced in obese patients with metabolic syndrome: application of a novel stable isotopic method. *J Hypertens* 2011;29(8):1515-27. doi: 10.1097/HJH.0b013e3283487806.
18. Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T, Shimamoto T. Relationship between urinary cGMP excretion and serum total cholesterol levels in a general population. *Atherosclerosis* 2005;179(2):379-86. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.10.031.
19. Voetsch B, Jin RC, Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. *Histochem Cell Biol* 2004;122(4):353-67. doi: 10.1007/s00418-004-0675-z.
20. Li H, Forstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system. *Curr Pharm Des* 2009;15(27):3133-45.
21. Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr* 2002;22:61-86. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.110901.145329.
22. Loscalzo J. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000;101(18):2126-9.
23. Wu G, Meininger CJ. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr* 2000;130(11):2626-9.
24. Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 2002;162(1):1-15.
25. Bode-Böger SM. Effect of L-arginine supplementation on NO production in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2006;62:91-9. doi: DOI 10.1007/s00228-005-0004-z.
26. Adams MR, Forsyth CJ, Jessup W, Robinson J, Celermajer DS. Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young men. *J Am Coll Cardiol* 1995;26(4):1054-61. doi: 10.1016/0735-1097(95)00257-9.
27. Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, Schenke WH, Kirby M, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon RO, 3rd. Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(2):271-6.
28. Siani A, Pagano E, Iacone R, Iacoviello L, Scopacasa F, Strazzullo P. Blood pressure and metabolic changes during dietary L-arginine supplementation in humans. *Am J Hypertens* 2000;13(5 Pt 1):547-51.
29. Bode-Böger SM, Muke J, Surdacki A, Brabant G, Boger RH, Frolich JC. Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years. *Vasc Med* 2003;8(2):77-81.
30. Bai Y, Sun L, Yang T, Sun K, Chen J, Hui R. Increase in fasting vascular endothelial function after short-term oral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2009;89(1):77-84. doi: 10.3945/ajcn.2008.26544.
31. Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci* 1982;401:1-8.
32. Feletou M. Edtion ed. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA), 2011.
33. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 2003;196(3):430-43. doi: 10.1002/jcp.10333.

34. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999;94(5):295-314.
35. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90(6):713-38. doi: 10.1139/y2012-073.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373-6.
37. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 1985;364:45-56.
38. Davies MG, Hagen PO. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 1993;218(5):593-609.
39. Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 2002;82(5):521-33.
40. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 1998;50(2):197-263.
41. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;45(1):18-31. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020.
42. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008;49(4-6):134-40. doi: 10.1016/j.vph.2008.06.008.
43. Welch G, Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg* 1994;9(3):361-71.
44. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;100(9):2146-52. doi: 10.1172/JCI119750.
45. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):593-615.
46. Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2005;108(3):225-56. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.005.
47. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004;500(1-3):255-66. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.030.
48. Song KS, Sargiacomo M, Galbiati F, Parenti M, Lisanti MP. Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1997;43(3):293-303.
49. Coppinger RJ, Baum CL. Cholesterol-dependent regulation of nitric oxide production: potential role in atherosclerosis. *Nutr Rev* 1999;57(9 Pt 1):279-82.
50. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995;91(5):1314-9.
51. Sase K, Michel T. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med* 1997;7(1):28-37. doi: 10.1016/S1050-1738(96)00121-1.
52. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284(1):R1-12. doi: 10.1152/ajpregu.00323.2002.

53. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2007;113(2):47-63. doi: 10.1042/CS20070108.
54. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336 (Pt 1):1-17.
55. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004;134(10 Suppl):2842S-7S; discussion 53S.
56. Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ, Chin-Dusting JP. In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. *Circulation* 2000;102(22):2707-12.
57. Morris SM, Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 2004;134(10 Suppl):2743S-7S; discussion 65S-67S.
58. Morris SM, Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* 2006;83(2):508S-12S.
59. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59(4):824-33.
60. Leiper JM, Vallance P. The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *European Journal of Clinical Pharmacology* 2006;62:33-8. doi: 10.1007/s00228-005-0013-y.
61. Cooke JP. DDAH: a target for vascular therapy? *Vasc Med* 2010;15(3):235-8. doi: 10.1177/1358863X10362605.
62. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S73-81.
63. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996;119(8):1533-40.
64. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003;108(24):3042-7. doi: 10.1161/01.CIR.0000101924.04515.2E.
65. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113(13):1708-14. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532.
66. Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, Berk BC. Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circ Res* 1999;85(1):29-37.
67. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(3):H981-6.
68. Elahi MM, Naseem KM, Matata BM. Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *FEBS J* 2007;274(4):906-23. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05660.x.
69. Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. *Thromb Haemost* 2007;98(5):970-4.
70. Ozuyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med* 2008;14(7):314-22. doi: 10.1016/j.molmed.2008.05.002.
71. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87(1):315-424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
72. Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232(11):1458-64. doi: 10.3181/0703-RM-64.

73. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(2):150-66. doi: 10.1038/nrm1569.
74. Derakhshan B, Hao G, Gross SS. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 2007;75(2):210-9. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.04.023.
75. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34(6):879-86.
76. Schini-Kerth VB. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol* 1999;6(6):355-63.
77. Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 2006;45(5):268-76. doi: 10.1016/j.vph.2006.08.002.
78. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12. doi: 10.1056/NEJM199312303292706.
79. Lauer T, Heiss C, Balzer J, Kehmeier E, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Meyer C, Merx MW, Kelm M, et al. Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise. *Basic Res Cardiol* 2008;103(3):291-7. doi: 10.1007/s00395-008-0714-3.
80. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(3):H985-1002. doi: 10.1152/ajpheart.00292.2006.
81. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(9):1631-74. doi: 10.1089/ars.2007.2013.
82. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 2008;103(5):398-406. doi: 10.1007/s00395-008-0733-0.
83. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003;108(16):1917-23. doi: 10.1161/01.CIR.0000089190.95415.9F.
84. Grover-Paez F, Zavalza-Gomez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;84(1):1-10. doi: 10.1016/j.diabres.2008.12.013.
85. Mozaffarian D, Wilson PW, Kannel WB. Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease. *Circulation* 2008;117(23):3031-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.738732.
86. Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A, Robinson K. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2000;9(1):13-21.
87. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med* 2002;252(4):283-94.
88. Avogaro A, Toffolo G, Kiwanuka E, de Kreutzenberg SV, Tessari P, Cobelli C. L-arginine-nitric oxide kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: a stable-labelled ¹⁵N arginine approach. *Diabetes* 2003;52(3):795-802.
89. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 1997;349(9055):837-42. doi: 10.1016/S0140-6736(96)07631-3.
90. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116(11):3015-25. doi: 10.1172/JCI28898.

91. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014;2014:943162. doi: 10.1155/2014/943162.
92. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006;368(1-2):33-47. doi: 10.1016/j.cca.2005.12.030.
93. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006;444(7121):875-80. doi: 10.1038/nature05487.
94. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial Dysfunction and Vascular Disease - A Thirtieth Anniversary Update. *Acta Physiol (Oxf)* 2015. doi: 10.1111/apha.12646.
95. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):29-38. doi: 10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13.
96. Siekmeier R, Grammer T, März W. Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13(4):279-97. doi: 10.1177/1074248408326488.
97. Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res* 2006;4(1):53-65.
98. West SG, Likos-Krick A, Brown P, Mariotti F. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *J Nutr* 2005;135(2):212-7.
99. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20 Suppl 12:S60-2.
100. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997;99(1):41-6. doi: 10.1172/JCI119131.
101. Loscalzo J, Vita JA. Nitric oxide and the cardiovascular system. 2000.
102. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91(6):2546-51. doi: 10.1172/JCI116491.
103. Mugge A, Brandes RP, Boger RH, Dwenger A, Bode-Boger S, Kienke S, Frolich JC, Lichtlen PR. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24(6):994-8.
104. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005;26(1-2):33-65. doi: 10.1016/j.mam.2004.09.003.
105. McVeigh GE, Cohn JN. Endothelial dysfunction and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 2003;3(1):87-92.
106. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-97.
107. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37(12):1595-607.
108. Blackburn P, Lemieux I, Almeras N, Bergeron J, Cote M, Tremblay A, Lamarche B, Despres JP. The hypertriglyceridemic waist phenotype versus the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation clinical criteria to identify high-risk men with an altered cardiometabolic risk profile. *Metabolism* 2009;58(8):1123-30. doi: 10.1016/j.metabol.2009.03.012.
109. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr., et al. Harmonizing the metabolic syndrome:

- a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120(16):1640-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
110. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, National Heart L, Blood I, American Heart A. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(2):e13-8. doi: 10.1161/01.ATV.0000111245.75752.C6.
 111. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33(2):351-75, table of contents. doi: 10.1016/j.ecl.2004.03.005.
 112. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care* 2004;27(10):2444-9.
 113. Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, Tichet J, Eschwège E, Group DESIRS. The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab* 2003;29(5):526-32.
 114. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2010;375(9710):181-3. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61794-3.
 115. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, Shofer JB, Fish BE, Knopp RH, Kahn SE. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004;53(8):2087-94.
 116. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(6):1039-49. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159228.
 117. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* 2008;29(24):2959-71. doi: 10.1093/eurheartj/ehn387.
 118. Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord* 2004;2(2):82-104. doi: 10.1089/met.2004.2.82.
 119. Bjorntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 1990;10(4):493-6.
 120. Jensen MD. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11 Suppl 1):S57-63. doi: 10.1210/jc.2008-1585.
 121. Boden G, Cheung P, Stein TP, Kresge K, Mozzoli M. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283(1):E12-9. doi: 10.1152/ajpendo.00429.2001.
 122. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM* 2006;99(1):1-14. doi: 10.1093/qjmed/hci154.
 123. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006;580(12):2917-21. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.028.
 124. Jullien D. [Pathogenesis of the metabolic syndrome]. *Ann Dermatol Venereol* 2008;135 Suppl 4:S243-8. doi: 10.1016/S0151-9638(08)70542-8.
 125. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin

- action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306(5695):457-61. doi: 10.1126/science.1103160.
126. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114(12):1752-61. doi: 10.1172/JCI21625.
 127. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res* 2006;45(1):42-72. doi: 10.1016/j.plipres.2005.11.002.
 128. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92(3):347-55.
 129. Velarde G, Berk BC. Role of hypertension in the metabolic syndrome: who is affected? *Curr Hypertens Rep* 2005;7(6):418-26.
 130. Huang PL. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(6):295-302. doi: 10.1016/j.tem.2009.03.005.
 131. Fernandez ML, Ruiz R, Gonzalez MA, Ramirez-Lorca R, Couto C, Ramos A, Gutierrez-Tous R, Rivera JM, Ruiz A, Real LM, et al. Association of NOS3 gene with metabolic syndrome in hypertensive patients. *Thromb Haemost* 2004;92(2):413-8. doi: 10.1267/THRO04080413.
 132. Cook S, Hugli O, Egli M, Vollenweider P, Burcelin R, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. Clustering of cardiovascular risk factors mimicking the human metabolic syndrome X in eNOS null mice. *Swiss Med Wkly* 2003;133(25-26):360-3. doi: 2003/25/smw-10239.
 133. Lucotti P, Setola E, Monti LD, Galluccio E, Costa S, Sandoli EP, Fermo I, Rabaiotti G, Gatti R, Piatti P. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(5):E906-12. doi: 10.1152/ajpendo.00002.2006.
 134. Wu G, Meininger CJ. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors* 2009;35(1):21-7. doi: 10.1002/biof.3.
 135. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003;108(12):1527-32. doi: 10.1161/01.CIR.0000091257.27563.32.
 136. Melikian N, Chowienzyk P, MacCarthy PA, Williams IL, Wheatcroft SB, Sherwood R, Gale C, Shah AM, Kearney MT. Determinants of endothelial function in asymptomatic subjects with and without the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2008;197(1):375-82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.06.009.
 137. Cozma A, Orasan O, Sampelean D, Fodor A, Vlad C, Negrean V, Rednic N, Zdrengea D. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Rom J Intern Med* 2009;47(2):133-40.
 138. Tesauro M, Cardillo C. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)* 2011;203(1):279-86. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02290.x.
 139. Del Turco S, Navarra T, Gastaldelli A, Basta G. Protective role of adiponectin on endothelial dysfunction induced by AGEs: a clinical and experimental approach. *Microvasc Res* 2011;82(1):73-6. doi: 10.1016/j.mvr.2011.03.003.
 140. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(4):972-8.
 141. Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, Girardet JP, Bonnet D. Presence of increased stiffness of the common carotid artery and

- endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study. *Lancet* 2001;358(9291):1400-4. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06525-4.
142. Anfossi G, Russo I, Doronzo G, Trovati M. Contribution of insulin resistance to vascular dysfunction. *Arch Physiol Biochem* 2009;115(4):199-217. doi: 10.1080/13813450903136791.
 143. Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 2002;33(8):1026-36.
 144. Han SH, Quon MJ, Koh KK. Reciprocal relationships between abnormal metabolic parameters and endothelial dysfunction. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(1):58-65. doi: 10.1097/MOL.0b013e328012b627.
 145. Landmesser U, Drexler H. Endothelial function and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2007;22(4):316-20. doi: 10.1097/HCO.0b013e3281ca710d.
 146. Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20(1):72-7. doi: 10.1016/j.numecd.2009.06.002.
 147. Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J Nutr Biochem* 2008;19(8):491-504. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.06.011.
 148. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003;52(9):2346-52.
 149. Di Renzo L, Galvano F, Orlandi C, Bianchi A, Di Giacomo C, La Fauci L, Acquaviva R, De Lorenzo A. Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18(11):2125-30. doi: 10.1038/oby.2010.50.
 150. Musaad S, Haynes EN. Biomarkers of obesity and subsequent cardiovascular events. *Epidemiol Rev* 2007;29:98-114. doi: 10.1093/epirev/mxm005.
 151. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010;7(1):15-25. doi: 10.1900/RDS.2010.7.15.
 152. Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. *Biochem Soc Trans* 2007;35(Pt 3):466-9. doi: 10.1042/BST0350466.
 153. Blackburn P, Despres JP, Lamarche B, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Couillard C. Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(10):1747-54. doi: 10.1038/oby.2006.201.
 154. Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? *Br J Nutr* 2005;93(1):3-9.
 155. Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R, Giugliano D. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(7):1145-50.
 156. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997;79(3):350-4.
 157. Wautier JL, Boulanger E, Wautier MP. Postprandial hyperglycemia alters inflammatory and hemostatic parameters. *Diabetes Metab* 2006;32 Spec No2:2S34-6.
 158. Herieka M, Erridge C. High-fat meal induced postprandial inflammation. *Mol Nutr Food Res* 2014;58(1):136-46. doi: 10.1002/mnfr.201300104.
 159. van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HW, De Jaegere PP, Cabezas MC. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy

- volunteers. *Atherosclerosis* 2004;177(1):175-82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.004.
160. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002;106(10):1211-8.
 161. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Esposito K, Giugliano D. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes* 2004;53(3):701-10.
 162. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 1997;95(7):1783-90.
 163. Akbari CM, Saouaf R, Barnhill DF, Newman PA, LoGerfo FW, Veves A. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in both microcirculation and macrocirculation during acute hyperglycemia. *J Vasc Surg* 1998;28(4):687-94.
 164. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Sia CL, Viswanathan P, Mohanty P, Dandona P. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(11):4476-9. doi: 10.1210/jc.2007-0778.
 165. O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 2007;100(5):899-904. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.03.107.
 166. Magne J, Mariotti F, Fischer R, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem* 2010;21(6):550-5. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.03.004.
 167. Abdelhamed AI, Reis SE, Sane DC, Brosnihan KB, Preli RB, Herrington DM. No effect of an L-arginine-enriched medical food (HeartBars) on endothelial function and platelet aggregation in subjects with hypercholesterolemia. *Am Heart J* 2003;145(3):E15. doi: 10.1067/mhj.2003.160.
 168. Bowen PE, Borthakur G. Postprandial lipid oxidation and cardiovascular disease risk. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6(6):477-84.
 169. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135(5):969-72.
 170. Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism* 2008;57(6):867-70. doi: 10.1016/j.metabol.2008.02.016.
 171. Magne J, Huneau JF, Tsikas D, Delemasure S, Rochette L, Tome D, Mariotti F. Rapeseed protein in a high-fat mixed meal alleviates postprandial systemic and vascular oxidative stress and prevents vascular endothelial dysfunction in healthy rats. *J Nutr* 2009;139(9):1660-6. doi: 10.3945/jn.109.107441.
 172. Bae JH, Bassenge E, Kim KB, Kim YN, Kim KS, Lee HJ, Moon KC, Lee MS, Park KY, Schwemmer M. Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis* 2001;155(2):517-23.
 173. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003;52(12):2882-7.

174. Anderson RA, Evans LM, Ellis GR, Khan N, Morris K, Jackson SK, Rees A, Lewis MJ, Frenneaux MP. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2006;23(3):258-64. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01767.x.
175. Neri S, Signorelli SS, Torrisi B, Pulvirenti D, Mauceri B, Abate G, Ignaccolo L, Bordonaro F, Cilio D, Calvagno S, et al. Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. *Clin Ther* 2005;27(11):1764-73. doi: 10.1016/j.clinthera.2005.11.006.
176. Westphal S, Taneva E, Kastner S, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger S, Kropf S, Dierkes J, Luley C. Endothelial dysfunction induced by postprandial lipemia is neutralized by addition of proteins to the fatty meal. *Atherosclerosis* 2006;185(2):313-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.004.
177. Tome D, Mariotti F, Huneau JF, Blachier F, Gaudichon C, Balage M, Bigard X, Boirie Y, Bos C, Bresson JL, et al. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. AFSSA.
178. Borucki K, Aronica S, Starke I, Luley C, Westphal S. Addition of 2.5 g L-arginine in a fatty meal prevents the lipemia-induced endothelial dysfunction in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2009;205(1):251-4. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.026.
179. Lin CC, Tsai WC, Chen JY, Li YH, Lin LJ, Chen JH. Supplements of L-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress. *Int J Cardiol* 2008;127(3):337-41. doi: 10.1016/j.ijcard.2007.06.013.
180. Loscalzo J. L-arginine and atherothrombosis. *J Nutr* 2004;134(10 Suppl):2798S-800S; discussion 818S-819S.
181. Morris SM, Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* 2009;157(6):922-30. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x.
182. Chen F, Lucas R, Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front Immunol* 2013;4:184. doi: 10.3389/fimmu.2013.00184.
183. van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *Am J Clin Nutr* 2004;79(2):185-97.
184. Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, Deutz NE. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303(10):E1177-89. doi: 10.1152/ajpendo.00284.2012.
185. Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65(1):51-9. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x.
186. Castillo L, Chapman TE, Sanchez M, Yu YM, Burke JF, Ajami AM, Vogt J, Young VR. Plasma arginine and citrulline kinetics in adults given adequate and arginine-free diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(16):7749-53.
187. Morris SMJ. Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis. In: Ignarro LJ, ed *Nitric oxide Biology and pathobiology* San Diego, CA: Academic Press, 2000:187-97.
188. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(3):715-9. doi: 10.1006/bbrc.2000.3169.

189. Castillo L, Beaumier L, Ajami AM, Young VR. Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(21):11460-5.
190. Watford M. The urea cycle: a two-compartment system. *Essays Biochem* 1991;26:49-58.
191. Morris SM, Jr. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7(1):45-51.
192. Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr* 1986;116(1):36-46.
193. Bode-Böger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D, Frolich JC. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46(5):489-97.
194. Tangphao O, Grossmann M, Chalon S, Hoffman BB, Blaschke TF. Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47(3):261-6.
195. Castillo L, Chapman TE, Yu YM, Ajami A, Burke JF, Young VR. Dietary arginine uptake by the splanchnic region in adult humans. *Am J Physiol* 1993;265(4 Pt 1):E532-9.
196. Mariotti F, Petzke KJ, Bonnet D, Szezepanski I, Bos C, Huneau JF, Fouillet H. Kinetics of the utilization of dietary arginine for nitric oxide and urea synthesis: insight into the arginine-nitric oxide metabolic system in humans. *Am J Clin Nutr* 2013;97(5):972-9. doi: 10.3945/ajcn.112.048025.
197. Gardiner KR, Gardiner RE, Barbul A. Reduced intestinal absorption of arginine during sepsis. *Crit Care Med* 1995;23(7):1227-32.
198. Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Benazeth S, Cynober L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005;29(3):177-205. doi: 10.1007/s00726-005-0235-4.
199. Ceballos I, Chauveau P, Guerin V, Bardet J, Parvy P, Kamoun P, Jungers P. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 1990;188(2):101-8.
200. Vente JP, von Meyenfeldt MF, van Eijk HM, van Berlo CL, Gouma DJ, van der Linden CJ, Soeters PB. Plasma-amino acid profiles in sepsis and stress. *Ann Surg* 1989;209(1):57-62.
201. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr* 2009;89(1):142-52. doi: 10.3945/ajcn.2007.25765.
202. Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 1998;128(8):1249-52.
203. Flam BR, Eichler DC, Solomonson LP. Endothelial nitric oxide production is tightly coupled to the citrulline-NO cycle. *Nitric Oxide* 2007;17(3-4):115-21. doi: 10.1016/j.niox.2007.07.001.
204. Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 1996;271(5 Pt 2):H1988-98.
205. Morris SM, Jr. Arginine metabolism in vascular biology and disease. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S83-7.
206. Marinova GV, Loyaga-Rendon RY, Obayashi S, Ishibashi T, Kubota T, Imamura M, Azuma H. Possible involvement of altered arginase activity, arginase type I and type II expressions, and nitric oxide production in occurrence of intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries. *J Pharmacol Sci* 2008;106(3):385-93.

207. Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC, et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 2003;108(16):2000-6. doi: 10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7.
208. Lim HK, Lim HK, Ryoo S, Benjo A, Shuleri K, Miriel V, Baraban E, Camara A, Soucy K, Nyhan D, et al. Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(6):H3317-24. doi: 10.1152/ajpheart.00700.2007.
209. Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, Humphrey JD, Kuo L. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* 2004;44(6):935-43. doi: 10.1161/01.HYP.0000146907.82869.f2.
210. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J* 2003;17(15):2328-30. doi: 10.1096/fj.03-0115fje.
211. Loyaga-Rendon RY, Sakamoto S, Beppu M, Aso T, Ishizaka M, Takahashi R, Azuma H. Accumulated endogenous nitric oxide synthase inhibitors, enhanced arginase activity, attenuated dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and intimal hyperplasia in premenopausal human uterine arteries. *Atherosclerosis* 2005;178(2):231-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.09.006.
212. Castillo L, deRojas TC, Chapman TE, Vogt J, Burke JF, Tannenbaum SR, Young VR. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(1):193-7.
213. Böger RH, Bode-Böger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:79-99. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.79.
214. Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1995;270(30):17641-4.
215. Jagnandan D, Sessa WC, Fulton D. Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(4):C1024-33. doi: 10.1152/ajpcell.00162.2005.
216. Simon A, Plies L, Habermeier A, Martine U, Reining M, Closs EI. Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Circ Res* 2003;93(9):813-20. doi: 10.1161/01.RES.0000097761.19223.0D.
217. Rasmussen C, Cynober L, Couderc R. [Arginine and statins: relationship between the nitric oxide pathway and the atherosclerosis development]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005;63(5):443-55.
218. Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Frolich JC. Differential inhibition of human platelet aggregation and thromboxane A2 formation by L-arginine in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;357(2):143-50.
219. Dambisya YM, Lee TL. A thromboelastography study on the in vitro effects of L-arginine and L-NG-nitro arginine methyl ester on human whole blood coagulation and fibrinolysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7(7):678-83.
220. Walter R, Mark M, Reinhart WH. Pharmacological concentrations of arginine influence human whole blood viscosity independent of nitric oxide synthase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269(3):687-91. doi: 10.1006/bbrc.2000.2344.

221. Grillo MA, Colombatto S. Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids* 2004;26(1):3-8. doi: 10.1007/s00726-003-0030-z.
222. Böger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* 2007;137(6 Suppl 2):1650S-5S.
223. Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, Coppola L, Cozzolino D, D'Onofrio F. The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest* 1997;99(3):433-8. doi: 10.1172/JCI119177.
224. Coiro V, Volpi R, Capretti L, Speroni G, Caffarri G, Chiodera P. Involvement of nitric oxide in arginine, but not glucose, induced insulin secretion in normal men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46(1):115-9.
225. Gornik HL, Creager MA. Arginine and endothelial and vascular health. *J Nutr* 2004;134(10 Suppl):2880S-7S; discussion 95S.
226. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest* 1992;90(3):1168-72. doi: 10.1172/JCI115937.
227. Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mugge A, Frolich JC. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997;96(4):1282-90.
228. Böger RH, Bode-Böger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frolich JC. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1998;136(1):67-77.
229. Maxwell AJ, Cooke JP. L-Arginine, its Role in Cardiovascular Therapy. In *Nitric Oxide and the Cardiovascular System*, ed J Loscalzo, JA Vita 2000:pp. 547–85.
230. Maxwell AJ, Cooke JP. Cardiovascular effects of L-arginine. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7(1):63-70.
231. Maxwell AJ, Anderson B, Zapien MP, Cooke JP. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is reversed by a nutritional product designed to enhance nitric oxide activity. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000;14(3):309-16.
232. Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE, McCredie R, Robinson J, McCarthy SN, Keech A, Celermajer DS, Deanfield JE. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 1996;97(8):1989-94. doi: 10.1172/JCI118632.
233. Chan JR, Boger RH, Bode-Boger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(4):1040-6.
234. Wolf A, Zalpour C, Theilmeier G, Wang BY, Ma A, Anderson B, Tsao PS, Cooke JP. Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol* 1997;29(3):479-85.
235. Theilmeier G, Chan JR, Zalpour C, Anderson B, Wang BY, Wolf A, Tsao PS, Cooke JP. Adhesiveness of mononuclear cells in hypercholesterolemic humans is normalized by dietary L-arginine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(12):3557-64.
236. Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, Magni F, Setola E, Marchesi F, Galli-Kienle M, Pozza G, Alberti KG. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001;24(5):875-80.
237. Rosano GM, Panina G, Cerquetani E, Leonardo F, Pelliccia F, Bonfigli B. L-arginine improves endothelial function in newly diagnosed hypertensives. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:262A (abstract).

238. Lekakis JP, Papathanassiou S, Papaioannou TG, Papamichael CM, Zakopoulos N, Kotsis V, Dagre AG, Stamatelopoulos K, Protogerou A, Stamatelopoulos SF. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol* 2002;86(2-3):317-23.
239. Jablecka A, Bogdanski P, Balcer N, Cieslewicz A, Skoluda A, Musialik K. The effect of oral L-arginine supplementation on fasting glucose, HbA1c, nitric oxide and total antioxidant status in diabetic patients with atherosclerotic peripheral arterial disease of lower extremities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16(3):342-50.
240. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995;333(4):214-21. doi: 10.1056/NEJM199507273330403.
241. Monti LD, Casiraghi MC, Setola E, Galluccio E, Pagani MA, Quaglia L, Bosi E, Piatti P. L-arginine enriched biscuits improve endothelial function and glucose metabolism: a pilot study in healthy subjects and a cross-over study in subjects with impaired glucose tolerance and metabolic syndrome. *Metabolism* 2013;62(2):255-64. doi: 10.1016/j.metabol.2012.08.004.
242. Adams MR, Jessup W, Celermajer DS. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: reversibility with oral L-arginine but not vitamin C. *J Am Coll Cardiol* 1997;29(3):491-7.
243. Siasos G, Tousoulis D, Vlachopoulos C, Antoniadis C, Stefanadi E, Ioakeimidis N, Andreou I, Zisimos K, Papavassiliou AG, Stefanadis C. Short-term treatment with L-arginine prevents the smoking-induced impairment of endothelial function and vascular elastic properties in young individuals. *Int J Cardiol* 2008;126(3):394-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2007.04.057.
244. Siasos G, Tousoulis D, Vlachopoulos C, Antoniadis C, Stefanadi E, Ioakeimidis N, Zisimos K, Siasou Z, Papavassiliou AG, Stefanadis C. The impact of oral L-arginine supplementation on acute smoking-induced endothelial injury and arterial performance. *Am J Hypertens* 2009;22(6):586-92. doi: 10.1038/ajh.2009.57.
245. Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH. Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: Effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(23):2274-82. doi: 10.1016/j.jacc.2007.02.051.
246. Ceremuzynski L, Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K. Effect of supplemental oral L-arginine on exercise capacity in patients with stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997;80(3):331-3.
247. Maxwell AJ, Zapien MP, Pearce GL, MacCallum G, Stone PH. Randomized trial of a medical food for the dietary management of chronic, stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(1):37-45.
248. Bednarz B, Wolk R, Chamiec T, Herbaczyńska-Cedro K, Winek D, Ceremuzynski L. Effects of oral L-arginine supplementation on exercise-induced QT dispersion and exercise tolerance in stable angina pectoris. *Int J Cardiol* 2000;75(2-3):205-10.
249. Yin WH, Chen JW, Tsai C, Chiang MC, Young MS, Lin SJ. L-arginine improves endothelial function and reduces LDL oxidation in patients with stable coronary artery disease. *Clin Nutr* 2005;24(6):988-97. doi: 10.1016/j.clnu.2005.07.003.
250. Adams MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997;129(2):261-9.

251. Lerman A, Burnett JC, Jr., Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR, Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 1998;97(21):2123-8.
252. Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, Schenke WH, Kirby M, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon RO, 3rd. Oral L-arginine in patients with coronary artery disease on medical management. *Circulation* 2000;101(18):2160-4.
253. Walker HA, McGing E, Fisher I, Boger RH, Bode-Boger SM, Jackson G, Ritter JM, Chowienczyk PJ. Endothelium-dependent vasodilation is independent of the plasma L-arginine/ADMA ratio in men with stable angina: lack of effect of oral L-arginine on endothelial function, oxidative stress and exercise performance. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(2):499-505.
254. Maxwell AJ, Anderson BE, Cooke JP. Nutritional therapy for peripheral arterial disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial of HeartBar. *Vasc Med* 2000;5(1):11-9.
255. Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Hornig B, Frolich JC, Boger RH. ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003;57(1):244-52.
256. Wilson AM, Harada R, Nair N, Balasubramanian N, Cooke JP. L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* 2007;116(2):188-95. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.683656.
257. Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K, Kubo SH. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 1996;93(12):2135-41.
258. Hambrecht R, Hilbrich L, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Schoene N, Schuler G. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(3):706-13.
259. Watanabe G, Tomiyama H, Doba N. Effects of oral administration of L-arginine on renal function in patients with heart failure. *J Hypertens* 2000;18(2):229-34.
260. Bednars B, Jaxa-Chamiec T, Gebalska J, Herbaczynska-Cedro K, Ceremuzynski L. L-arginine supplementation prolongs exercise capacity in congestive heart failure. *Kardiologia Pol* 2004;60(4):348-53.
261. Chin-Dusting JP, Kaye DM, Lefkovits J, Wong J, Bergin P, Jennings GL. Dietary supplementation with L-arginine fails to restore endothelial function in forearm resistance arteries of patients with severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(5):1207-13. doi: 10.1016/0735-1097(95)00611-7.
262. Chin-Dusting JP, Alexander CT, Arnold PJ, Hodgson WC, Lux AS, Jennings GL. Effects of in vivo and in vitro L-arginine supplementation on healthy human vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28(1):158-66.
263. Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Roscini AR, Vaudo G, Sinzinger H, Mannarino E. Oral L-arginine administration attenuates postprandial endothelial dysfunction in young healthy males. *J Clin Pharm Ther* 2001;26(5):343-9.
264. Mariotti F, Huneau JF, Szezepanski I, Petzke KJ, Aggoun Y, Tomé D, Bonnet D. Meal amino acids with varied levels of arginine do not affect postprandial vascular endothelial function in healthy young men. *J Nutr* 2007;137(6):1383-9.
265. Siasos G, Tousoulis D, Antoniadis C, Stefanadi E, Stefanadis C. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? *Int J Cardiol* 2007;116(3):300-8. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.04.062.

266. Abou-Mohamed G, Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Caldwell RW. Role of L-arginine in the vascular actions and development of tolerance to nitroglycerin. *Br J Pharmacol* 2000;130(2):211-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0703293.
267. De Meyer GR, Bult H, Kockx MM, Herman AG. The effect of chronic treatment with NO donors during intimal thickening and fatty streak formation. *Biofactors* 1997;6(2):209-15.
268. Chen J, Kuhlencordt P, Urano F, Ichinose H, Astern J, Huang PL. Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(1):97-103.
269. Teerlink T. Letter by Teerlink regarding article, "L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm". *Circulation* 2008;117(6):e157; author reply e8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729830.
270. Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, Ernst KV, Kelemen MD, Townsend SN, Capriotti A, et al. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* 2006;295(1):58-64. doi: 10.1001/jama.295.1.58.
271. Loscalzo J. Adverse effects of supplemental L-arginine in atherosclerosis: consequences of methylation stress in a complex catabolism? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(1):3-5.
272. Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther* 2007;114(3):295-306. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.002.
273. McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997;272(50):31213-6.
274. Shin S, Mohan S, Fung HL. Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: implications on the "L-arginine paradox". *Biochem Biophys Res Commun* 2011;414(4):660-3. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.112.
275. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339(8793):572-5.
276. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(9):2032-7.
277. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006;38(2):126-36. doi: 10.1080/07853890500472151.
278. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87(2):99-105.
279. Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005;10(1):14-23.
280. Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288(4):R1057-62. doi: 10.1152/ajpregu.00758.2004.
281. Li H, Meininger CJ, Hawker JR, Jr., Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM, Jr., Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and

- proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(1):E75-82.
282. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Caldwell RB, Caldwell RW. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 2008;102(1):95-102. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155028.
 283. Ryoo S, Lemmon CA, Soucy KG, Gupta G, White AR, Nyhan D, Shoukas A, Romer LH, Berkowitz DE. Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling. *Circ Res* 2006;99(9):951-60. doi: 10.1161/01.RES.0000247034.24662.b4.
 284. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, Kuo L. Upregulation of arginase by H₂O₂ impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(9):2035-42. doi: 10.1161/01.ATV.0000233334.24805.62.
 285. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005;294(1):81-90. doi: 10.1001/jama.294.1.81.
 286. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9220-5.
 287. Arnal JF, Munzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J Clin Invest* 1995;95(6):2565-72. doi: 10.1172/JCI117957.
 288. Meininger CJ, Wu G. L-glutamine inhibits nitric oxide synthesis in bovine venular endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281(1):448-53.
 289. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994;94(3):1172-9. doi: 10.1172/JCI117433.
 290. Mariotti F, Mahe S, Luengo C, Benamouzig R, Tomé D. Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen utilization by carbohydrates in humans. *Am J Clin Nutr* 2000;72(4):954-62.
 291. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O, Beaufrère B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(2):E340-8.
 292. Beaumier L, Castillo L, Ajami AM, Young VR. Urea cycle intermediate kinetics and nitrate excretion at normal and "therapeutic" intakes of arginine in humans. *Am J Physiol* 1995;269(5 Pt 1):E884-96.
 293. Fouillet H, Juillet B, Gaudichon C, Mariotti F, Tomé D, Bos C. Absorption kinetics are a key factor regulating postprandial protein metabolism in response to qualitative and quantitative variations in protein intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297(6):R1691-705. doi: 10.1152/ajpregu.00281.2009.
 294. Kurz S, Harrison DG. Insulin and the arginine paradox. *J Clin Invest* 1997;99(3):369-70. doi: 10.1172/JCI119166.
 295. Tsikas D, Böger RH, Sandmann J, Bode-Böger SM, Frölich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000;478(1-2):1-3.

296. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4843-8. doi: 10.1073/pnas.0735876100.
297. Wyatt AW, Steinert JR, Mann GE. Modulation of the L-arginine/nitric oxide signalling pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Soc Symp* 2004(71):143-56.
298. Joshi MS, Ferguson TB, Jr., Johnson FK, Johnson RA, Parthasarathy S, Lancaster JR, Jr. Receptor-mediated activation of nitric oxide synthesis by arginine in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(24):9982-7. doi: 10.1073/pnas.0506824104.
299. Poppitt SD. Postprandial Lipaemia, Haemostasis, Inflammatory Response and other Emerging Risk Factors for Cardiovascular Disease: The Influence of Fatty Meals. *Curr Nutr Food Sci* 2005;1: 23-34.
300. Magné J, Huneau JF, Delemasure S, Rochette L, Tomé D, Mariotti F. Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats. *Nitric Oxide* 2009;21(1):37-43. doi: 10.1016/j.niox.2009.04.003.
301. Mah E, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *Nutr Res* 2012;32(10):727-40. doi: 10.1016/j.nutres.2012.08.002.
302. Mah E, Noh SK, Ballard KD, Matos ME, Volek JS, Bruno RS. Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine:arginine. *J Nutr* 2011;141(11):1961-8. doi: 10.3945/jn.111.144592.
303. Tang WH, Shrestha K, Wang Z, Troughton RW, Klein AL, Hazen SL. Diminished global arginine bioavailability as a metabolic defect in chronic systolic heart failure. *J Card Fail* 2013;19(2):87-93. doi: 10.1016/j.cardfail.2013.01.001.
304. Moss MB, Brunini TM, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro AC. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2004;107(4):391-7. doi: 10.1042/CS20030412.
305. Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation* 2004;110(24):3680-6. doi: 10.1161/01.CIR.0000149748.79945.52.
306. Tang WH, Wang Z, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(22):2061-7. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.036.
307. Morris CR, Kim HY, Klings ES, Wood J, Porter JB, Trachtenberg F, Sweeters N, Olivieri NF, Kwiatkowski JL, Virzi L, et al. Dysregulated arginine metabolism and cardiopulmonary dysfunction in patients with thalassaemia. *Br J Haematol* 2015;169(6):887-98. doi: 10.1111/bjh.13452.
308. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Sweeters N, Simon J, Vichinsky EP, Styles LA. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2000;111(2):498-500.
309. Yeo TW, Lampah DA, Rooslamia I, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, Price RN, Duffull SB, Anstey NM. A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PLoS One* 2013;8(7):e69587. doi: 10.1371/journal.pone.0069587.
310. Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T, Shimamoto T. Metabolic syndrome and urinary cGMP excretion in general population. *Atherosclerosis* 2007;190(2):423-8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.032.

311. Siervo M, Stephan BC, Feelisch M, Bluck LJ. Measurement of in vivo nitric oxide synthesis in humans using stable isotopic methods: a systematic review. *Free Radic Biol Med* 2011;51(4):795-804. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.032.
312. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98(18):1842-7.
313. Arsenault BJ, Lemieux I, Després JP, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. The hypertriglyceridemic-waist phenotype and the risk of coronary artery disease: results from the EPIC-Norfolk prospective population study. *CMAJ* 2010;182(13):1427-32. doi: 10.1503/cmaj.091276.
314. Gomez-Huelgas R, Bernal-Lopez MR, Villalobos A, Mancera-Romero J, Baca-Osorio AJ, Jansen S, Guijarro R, Salgado F, Tinahones FJ, Serrano-Rios M. Hypertriglyceridemic waist: an alternative to the metabolic syndrome? Results of the IMAP Study (multidisciplinary intervention in primary care). *Int J Obes (Lond)* 2011;35(2):292-9. doi: 10.1038/ijo.2010.127.
315. Magne J. Caractérisation d'un modèle de dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain : intérêt de la modulation de la nature des protéines en termes de prévention du risque cardiovasculaire. 2009.
316. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41(6 Pt 1):892-6.
317. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med* 2007;43(5):645-57. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.
318. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(22):12814-9. doi: 10.1073/pnas.221381098.
319. Rassaf T, Heiss C, Hendgen-Cotta U, Balzer J, Matern S, Kleinbongard P, Lee A, Lauer T, Kelm M. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic Biol Med* 2006;41(2):295-301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.006.
320. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(5):915-22. doi: 10.1161/01.ATV.0000161048.72004.c2.
321. Rassaf T, Feelisch M, Kelm M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med* 2004;36(4):413-22. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.011.
322. Hendgen-Cotta U, Grau M, Rassaf T, Gharini P, Kelm M, Kleinbongard P. Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of the nitric oxide pool in biological matrices. *Methods Enzymol* 2008;441:295-315. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01216-0.
323. Moshage H. Nitric oxide determinations: much ado about NO.-thing? *Clin Chem* 1997;43(4):553-6.
324. Luiking YC, Deutz NE. Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6(1):103-8. doi: 10.1097/01.mco.0000049045.06038.79.
325. Kleschyov AL, Wenzel P, Munzel T. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851(1-2):12-20. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.10.006.

326. van Eijk HM, Luiking YC, Deutz NE. Methods using stable isotopes to measure nitric oxide (NO) synthesis in the L-arginine/NO pathway in health and disease. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851(1-2):172-85. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.08.054.
327. Heiss C, Lauer T, Dejam A, Kleinbongard P, Hamada S, Rassaf T, Matern S, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(3):573-9. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.089.
328. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000;184(3):409-20. doi: 10.1002/1097-4652(200009)184:3<409::AID-JCP16>3.0.CO;2-K.
329. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 2003;93(2):96-105. doi: 10.1161/01.RES.0000082524.34487.31.
330. Mair J, Puschendorf B. Is measurement of cyclic guanosine monophosphate in plasma or urine suitable for assessing in vivo nitric oxide production? *Circulation* 1998;97(12):1209-10.
331. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997;96(12):4219-25.
332. Joannides R, Bellien J, Thuilleux C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol* 2006;20(3):311-20. doi: 10.1111/j.1472-8206.2006.00406.x.
333. Ridker PM. C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(21):2129-38. doi: 10.1016/j.jacc.2007.02.052.
334. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem* 2009;55(2):229-38. doi: 10.1373/clinchem.2008.108886.
335. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;102(9):1000-6.
336. Jansson JH, Olofsson BO, Nilsson TK. Predictive value of tissue plasminogen activator mass concentration on long-term mortality in patients with coronary artery disease. A 7-year follow-up. *Circulation* 1993;88(5 Pt 1):2030-4.
337. Lerman A, Holmes DR, Jr., Bell MR, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC, Jr. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995;92(9):2426-31.
338. Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, Brockhaus M, Schaefer HE, Loeffler BM. Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* 2001;104(8):864-9.
339. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, Tripepi G, Sesti G, Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(3):518-23. doi: 10.1016/j.jacc.2005.04.040.
340. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 2011;32(11):659-65. doi: 10.1016/j.tips.2011.06.005.
341. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340(8828):1111-5.

342. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115(10):1285-95. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.
343. Puissant C, Abraham P, Durand S, Humeau-Heurtier A, Faure S, Rousseau P, Mahe G. [Endothelial function: role, assessment and limits]. *J Mal Vasc* 2014;39(1):47-56. doi: 10.1016/j.jmv.2013.11.004.
344. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancina G, Oliver JJ, Pessina AC, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005;23(1):7-17.
345. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Luscher TF, Shechter M, Taddei S, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 2012;126(6):753-67. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245.
346. Donald AE, Halcox JP, Charakida M, Storry C, Wallace SM, Cole TJ, Friberg P, Deanfield JE. Methodological approaches to optimize reproducibility and power in clinical studies of flow-mediated dilation. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(20):1959-64. doi: 10.1016/j.jacc.2008.02.044.
347. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* (1985) 2006;101(2):545-8. doi: 10.1152/japplphysiol.01285.2005.
348. Wilkinson IB, MacCallum H, Flint L, Cockcroft JR, Newby DE, Webb DJ. The influence of heart rate on augmentation index and central arterial pressure in humans. *J Physiol* 2000;525 Pt 1:263-70.
349. Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19(1):6-11. doi: 10.1016/j.tcm.2009.03.001.
350. Bellien J, Favre J, Iacob M, Gao J, Thuillez C, Richard V, Joannides R. Arterial stiffness is regulated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor during changes in blood flow in humans. *Hypertension* 2010;55(3):674-80. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.142190.
351. Lehmann ED. Noninvasive measurements of aortic stiffness: methodological considerations. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47(7):716-30.
352. Chowienzyk PJ, Kelly RP, MacCallum H, Millasseau SC, Andersson TL, Gosling RG, Ritter JM, Anggard EE. Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(7):2007-14.
353. Millasseau SC, Kelly RP, Ritter JM, Chowienzyk PJ. Determination of age-related increases in large artery stiffness by digital pulse contour analysis. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(4):371-7. doi: 10.1042/.
354. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117(19):2467-74. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748574.
355. Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, Karas RH, Udelson JE. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146(1):168-74. doi: 10.1016/S0002-8703(03)00094-2.

356. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(4):554-66. doi: 10.1161/01.ATV.0000060460.52916.D6.
357. Cecelja M, Chowienczyk P. Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension* 2009;54(6):1328-36. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137653.
358. McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med* 2003;139(10):802-9.
359. Taskinen MR. Type 2 diabetes as a lipid disorder. *Curr Mol Med* 2005;5(3):297-308.
360. Nawabzad R, Champin B. [Concordance between three definitions for metabolic syndrome (Hypertriglyceridemic waist, National Cholesterol Education Program, International Diabetes Federation), and prevalence of the syndrome in a French population]. *Rev Prat* 2010;60(10 Suppl):15-23.
361. Blackburn P, Lemieux I, Lamarche B, Bergeron J, Perron P, Tremblay G, Gaudet D, Despres JP. Hypertriglyceridemic waist: a simple clinical phenotype associated with coronary artery disease in women. *Metabolism* 2012;61(1):56-64. doi: 10.1016/j.metabol.2011.05.017.
362. Delarue J, Beylot M. Les traceurs isotopiques stables en nutrition humaines. Que peut-on faire avec ? . *Cahier de nutrition et de diététique* 2007:42.
363. Wolfe RR, Chinkes DL. Chapter 1: Basic characteristics of isotopic tracers. In: Wiley editor *Isotope tracers in metabolic research Principles and practice of kinetic analysis* 2nd edition 2005.
364. Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 2003;3(4):279-88.
365. Ohta F, Takagi T, Sato H, Ignarro LJ. Low-dose L-arginine administration increases microperfusion of hindlimb muscle without affecting blood pressure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(4):1407-11. doi: 10.1073/pnas.0610207104.
366. Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL, Lemosquet S. Milk protein synthesis in response to the provision of an "ideal" amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *J Dairy Sci* 2012;95(10):5876-87. doi: 10.3168/jds.2011-5230.
367. Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem* 1989;61(24):2715-8.
368. Marini JC, Didelija IC, Castillo L, Lee B. Plasma arginine and ornithine are the main citrulline precursors in mice infused with arginine-free diets. *J Nutr* 2010;140(8):1432-7. doi: 10.3945/jn.110.125377.
369. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(23):10480-4.
370. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 2002;18(9):761-6.
371. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, Ritter JM. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension* 1998;32(4):730-4.
372. Mariotti F, Valette M, Lopez C, Fouillet H, Famelart MH, Mathe V, Airinei G, Benamouzig R, Gaudichon C, Tome D, et al. Casein Compared with Whey Proteins

- Affects the Organization of Dietary Fat during Digestion and Attenuates the Postprandial Triglyceride Response to a Mixed High-Fat Meal in Healthy, Overweight Men. *J Nutr* 2015;145(12):2657-64. doi: 10.3945/jn.115.216812.
373. Barringer TA, Hatcher L, Sasser HC. Potential benefits on impairment of endothelial function after a high-fat meal of 4 weeks of flavonoid supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:796958. doi: 10.1093/ecam/nen048.
 374. McCrea CE, Skulas-Ray AC, Chow M, West SG. Test-retest reliability of pulse amplitude tonometry measures of vascular endothelial function: implications for clinical trial design. *Vasc Med* 2012;17(1):29-36. doi: 10.1177/1358863X11433188.
 375. Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300(1):H2-12. doi: 10.1152/ajpheart.00471.2010.
 376. Lefèbvre PJ, Scheen AJ. The postprandial state and risk of cardiovascular disease. *Diabet Med* 1998;15 Suppl 4:S63-8. doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(1998120)15:4+S63::AID-DIA737>3.0.CO;2-7.
 377. Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, Jimenez JJ, Mauro LM, Chirinos JA, Ghany R, Virani S, Garcia S, Horstman LL, et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation* 2004;110(23):3599-603. doi: 10.1161/01.CIR.0000148820.55611.6B.
 378. Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, Galluzzo A, AlkaMeSy Study G. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 2010;33(4):920-2. doi: 10.2337/dc09-1825.
 379. International Physical Activity Questionnaire website. Guidelines for the data processing and analysis of the "International Physical Activity Questionnaire". November 2005. Internet: <https://sites.google.com/site/theipaq/scoring-protocol>.
 380. West SG, Wagner P, Schoemer SL, Hecker KD, Hurston KL, Likos Krick A, Boseska L, Ulbrecht J, Hinderliter AL. Biological correlates of day-to-day variation in flow-mediated dilation in individuals with Type 2 diabetes: a study of test-retest reliability. *Diabetologia* 2004;47(9):1625-31. doi: 10.1007/s00125-004-1502-8.
 381. West SG, Hecker KD, Mustad VA, Nicholson S, Schoemer SL, Wagner P, Hinderliter AL, Ulbrecht J, Ruey P, Kris-Etherton PM. Acute effects of monounsaturated fatty acids with and without omega-3 fatty acids on vascular reactivity in individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005;48(1):113-22. doi: 10.1007/s00125-004-1600-7.
 382. Gemignani V, Bianchini E, Faita F, Giannarelli C, Plantinga Y, Ghiadoni L, Demi M. Ultrasound measurement of the brachial artery flow-mediated dilation without ECG gating. *Ultrasound Med Biol* 2008;34(3):385-91. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.08.006.
 383. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(11):2137-41. doi: 10.1016/j.jacc.2004.08.062.
 384. Hall WL, Sanders KA, Sanders TA, Chowienzyk PJ. A high-fat meal enriched with eicosapentaenoic acid reduces postprandial arterial stiffness measured by digital volume pulse analysis in healthy men. *J Nutr* 2008;138(2):287-91.
 385. Ayer JG, Harmer JA, Steinbeck K, Celermajer DS. Postprandial vascular reactivity in obese and normal weight young adults. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18(5):945-51. doi: 10.1038/oby.2009.331.

386. Pfeuffer M, Fielitz K, Laue C, Winkler P, Rubin D, Helwig U, Giller K, Kammann J, Schwedhelm E, Böger RH, et al. CLA does not impair endothelial function and decreases body weight as compared with safflower oil in overweight and obese male subjects. *J Am Coll Nutr* 2011;30(1):19-28.
387. Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasan RS, Keaney JF, Jr., Lehman BT, Fan S, Osypiuk E, Vita JA. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;109(5):613-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000112565.60887.1E.
388. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, Nubret E, Sarfati G, Bergheim I, De Bandt JP. Citrulline and Nonessential Amino Acids Prevent Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *J Nutr* 2015. doi: 10.3945/jn.115.218982.
389. Breuillard C, Belabed L, Bonhomme S, Blanc-Quintin MC, Neveux N, Couderc R, De Bandt JP, Cynober L, Darquy S. Arginine availability modulates arginine metabolism and TNFalpha production in peritoneal macrophages from Zucker Diabetic Fatty rats. *Clin Nutr* 2012;31(3):415-21. doi: 10.1016/j.clnu.2011.11.012.
390. Luiking YC, Poeze M, Deutz NE. Arginine infusion in patients with septic shock increases nitric oxide production without haemodynamic instability. *Clin Sci (Lond)* 2015;128(1):57-67. doi: 10.1042/CS20140343.
391. Ball RO, Urschel KL, Pencharz PB. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *J Nutr* 2007;137(6 Suppl 2):1626S-41S.
392. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Harrison DG, Quyyumi AA. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(5):1005-11. doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.063.
393. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 2002;17:251-5.
394. Gamé X, Rischmann P, Arnal JF, Malavaud B. Voie du monoxyde d'azote et bas appareil urinaire féminin. Rôles physiologique et physiopathologique. *Prog Urol* 2013;23(11):926-35.
395. Elrod JW, Lefer DJ. The effects of statins on endothelium, inflammation and cardioprotection. *Drug News Perspect* 2005;18(4):229-36. doi: 10.1358/dnp.2005.18.4.908656.
396. Lacolley P, Babuty D, Boulanger C, ghaleh B, Loirand G, Pinet F, Samuel JL. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. 2008.
397. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004;109(21 Suppl 1):II27-33. doi: 10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f.
398. Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2276-83. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.147835.
399. Guarner V, Rubio-Ruiz ME. Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Interdiscip Top Gerontol* 2015;40:99-106. doi: 10.1159/000364934.
400. Ceriello A. The post-prandial state and cardiovascular disease: relevance to diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16(2):125-32.
401. Norata GD, Grigore L, Raselli S, Redaelli L, Hamsten A, Maggi F, Eriksson P, Catapano AL. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. *Atherosclerosis* 2007;193(2):321-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.09.015.

402. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003;83(1):183-252. doi: 10.1152/physrev.00022.2002.
403. Joannides R, Bellien J. Les méthodes cliniques d'exploration de la fonction endothéliale *Sang Thrombose Vaisseaux* 2003;15(7).

Titre : Supplémentation nutritionnelle en arginine chez des sujets sains présentant des facteurs de risque liés au syndrome métabolique : métabolisme de l'arginine alimentaire et impact sur la fonction endothéliale

Mots clés : monoxyde d'azote, métabolisme de l'arginine, supplémentation en arginine, isotopes stables, syndrome métabolique, fonction endothéliale, période postprandiale.

Résumé : La dysfonction endothéliale vasculaire, processus majeur initiant l'athérosclérose, est étroitement liée à l'altération de la synthèse et/ou biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO), dont l'arginine est le précurseur. Elle apparaît aussi dès la phase postprandiale après un repas gras et sucré. Chez des sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique, une supplémentation orale en arginine a un effet bénéfique sur des fonctions associées au NO. Aucune donnée ne permet cependant de lier la mise à disposition de l'arginine et la synthèse de NO, en situation normale ou de risque cardiométabolique. De plus, peu d'études ont étudié l'effet d'une supplémentation en arginine, dans un contexte nutritionnel (faible dose et libération lente) chez des sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique. Ce travail vise donc à évaluer l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en arginine, sur le métabolisme de l'arginine et la fonction endothéliale (FE), chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Dans une première étude clinique, nous avons ainsi comparé la biodisponibilité de l'arginine ingérée et son utilisation pour la synthèse de NO, selon la présence de facteurs de risque cardiométabolique, et selon qu'elle était consommée sous une forme à libération immédiate (LI) ou sous une forme à libération prolongée (LP), mimant la mise à disposition naturelle de l'arginine alimentaire. Puis, dans une deuxième étude clinique, nous avons étudié l'effet de la supplémentation en arginine LP sur la FE à jeun et sur son altération postprandiale, chez des sujets sains présentant des facteurs de risque cardiométabolique; et si cet effet pourrait varier selon leur argininémie basale. Ce travail de thèse a ainsi mis en évidence une utilisation de l'arginine ingérée plus élevée pour la synthèse de NO chez les sujets avec des facteurs de risque cardiométabolique, et plus élevée avec la forme LP qu'avec la forme LI, en particulier chez ces sujets à risque. La deuxième étude, quant à elle, a révélé que les effets de la supplémentation en arginine-LP variaient selon l'argininémie basale des sujets présentant des facteurs de risque cardiométabolique. Chez les sujets avec une argininémie basale relativement plus faible, l'arginine-LP a atténué la diminution postprandiale de la FE et a conduit à une FE significativement meilleure à la fin de la période postprandiale.

Title : Nutritional arginine supplementation in healthy subjects with risk factors associated with metabolic syndrome: dietary arginine metabolism and impact on endothelial function

Keywords : nitric oxide, arginine metabolism, arginine supplementation, stable isotopes, metabolic syndrome, endothelial function, postprandial period.

Abstract : Vascular endothelial dysfunction, the hallmark of early atherosclerosis, results from an impairment of the synthesis and/or bioavailability of nitric oxide (NO), the precursor of which is arginine. Endothelial dysfunction is also known to be induced transiently by a high-fat meal. In subject with cardiometabolic risk factors, oral arginine supplementation has a beneficial effect on NO-related physiological functions. However, no data relates the availability of arginine to the synthesis of NO in normal or cardiometabolic risk condition. In addition, few studies only have investigated the effect of arginine supplementation in a nutritional context (low dose and slow release) in subjects with cardiometabolic risk factors. This work aims to evaluate the effect of a nutritional arginine supplementation, on the arginine metabolism and endothelial function in healthy subjects with cardiometabolic risk factors. In a first clinical study, we have compared the bioavailability of oral arginine and its utilization for NO synthesis, as a function of the presence of cardiometabolic risk factors, and as a function of the form of release (immediate release, IR, as free arginine, or sustained release, SR, which mimics the slow release of dietary arginine). Then, in a second clinical study, we studied the effect of SR-arginine supplementation on fasting endothelial function and its postprandial alteration in healthy subjects with cardiometabolic factors. A further aim was to investigate whether this effect may vary according to the baseline arginine status of subjects. This thesis work has demonstrated a higher utilization of oral arginine for NO synthesis in subjects with cardiometabolic risk factors, and a higher utilization with the SR form, particularly in these subjects at risk. As to the second study, it showed that the SR-arginine supplementation effects largely varied with baseline fasting arginine concentration of subjects with cardiometabolic risk factors. In subjects with a relatively lower baseline arginine concentration, SR-arginine attenuated the decrease in postprandial endothelial function and led to a significantly higher endothelial function at the end of the postprandial period.

