La régulation de la perfusion musculaire dépendante du monoxyde d'azote (NO) : effet de l'aptitude aérobie et des facteurs de risques cardiovasculaires liés à la diméthylarginine asymétrique

Mehdi Pawlak-Chaouch

▶ **To cite this version:**

Mehdi Pawlak-Chaouch. La régulation de la perfusion musculaire dépendante du monoxyde d'azote (NO) : effet de l'aptitude aérobie et des facteurs de risques cardiovasculaires liés à la diméthylarginine asymétrique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S055 . tel-02276623

HAL Id: tel-02276623

https://theses.hal.science/tel-02276623

Submitted on 3 Sep 2019

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

Spécialité

Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Présentée par

Mehdi PAWLAK-CHAOUCH

Le 11 décembre 2017

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

La régulation de la perfusion musculaire dépendante du monoxyde d'azote (NO) : effet de l'aptitude aérobie et des facteurs de risques cardiovasculaires liés à la diméthylarginine asymétrique

Composition du jury :

Rapporteurs	**Costantino BALESTRA**, Professeur, Université Libre de Bruxelles
	Patrice FLORE, Maître de Conférences (HDR), Université de Grenoble
Examinateurs	**Martine DUCLOS**, Professeur-Praticien hospitalier, Université d'Auvergne
	Laurent MOUROT, Maître de Conférences (HDR), Université de Franche-Comté
	Agnès VINET, Professeur, Université d'Avignon
Directeur de Thèse	**Serge BERTHOIN**, Professeur, Université de Lille Droit et Santé
Co-encadrant	**Julien AUCOUTURIER**, Maître de Conférences, Université de Lille Droit et Santé

EA7369 – Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société, Université de Lille Droit et Santé

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes plus vifs remerciements au Professeur **Serge BERTHOIN**, Directeur de l'Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport, Santé, Société – EA7369, qui a été pour moi un directeur de Thèse attentif, accessible et disponible malgré ses charges de travail très importantes. Le professeur Serge BERTHOIN a su m'apporter son soutien et des conseils avisés à la hauteur de ses compétences et de ses qualités humaines.

J'adresse ensuite mes chaleureux remerciements au Docteur **Julien AUCOUTURIER**, mon encadrant durant cette Thèse (et même au cours de mes années de Master), pour sa confiance, ses connaissances scientifiques, ses critiques et conseils constructifs. Merci de m'avoir permis d'exprimer et de développer mon esprit d'initiative et mon sens des responsabilités durant toutes ces années.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à **Costantino BALESTRA**, Professeur, et **Patrice FLORE**, Maître de Conférences, pour avoir accepté de faire partie de mon Comité de Suivi de Thèse (CST). Nos échanges au cours des CST, leurs remarques pertinentes et conseils judicieux ont guidé mes travaux de recherche.

Mes remerciements s'adressent également à **Martine DUCLOS**, Professeur-Praticien Hospitalier ; à **Laurent MOUROT**, Maître de Conférences et à **Agnès VINET**, Professeur, qui ont accepté de faire partie de mon jury de Thèse. J'en suis très honoré et j'espère que mes travaux réalisés au cours de ce Doctorat leur apporteront satisfaction.

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire qui se sont impliqués à différentes périodes dans mes travaux de Thèse, et tout particulièrement le Docteur **Julien BOISSIERE**, le Professeur **Marie Hélène CANU**, le Docteur **François Xavier GAMELIN** et le Docteur **Elsa HEYMAN**, pour leurs compétences techniques et leurs connaissances.

Je remercie aussi **Grégory CUVELIER**, responsable du Laboratoire de l'Effort et du Mouvement à Tournai, pour son accueil, sa gentillesse, sa disponibilité et ses compétences.

J'adresse également mes remerciements à Justine **GAMAIN**, gestionnaire administrative, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide et son soutien dans les démarches spécifiques aux commandes et marché public. Mes remerciements vont aussi au personnel de l'animalerie d'Eurasport, en particulier les techniciennes, **Julie DEREUMETZ** et **Valérie MONTEL** pour leur disponibilité et leurs précieux conseils lors des expérimentations animales.

Je tiens à remercier chaleureusement **Désiré MUNYANEZA**, alors étudiant en Master, pour sa contribution et son implication lors de mes travaux de recherche expérimentale.

Je voudrais enfin remercier l'ensemble de mes collègues et amis Doctorants, **Agathe, Elodie, Julie, Matthias et Samir** pour leur amitié, leur soutien quotidien et les bons moments passés lors de nos soirées. Merci tout spécialement à mon ami **Baptiste CHEHERE** et **sa compagne**, toujours présents dans les bons moments comme les moments difficiles. J'ai tout particulièrement apprécié les déjeuners et soirées passés à vos côtés, les « débriefings » avec toi, Baptiste, au tour d'un verre en fin de journée. Baptiste, c'est avec plaisir que je t'invite à ce que nous poursuivions cette bonne et chaleureuse habitude !

À titre plus personnel, je tiens à exprimer ma plus grande gratitude envers **ma famille**, et tout particulièrement **ma mère** pour sa grande patience et son soutien permanent au cours de mes longues études.

En dernier lieu, je remercie la **Région Haut-de-France** pour avoir participé au financement de mes trois années de Thèse.

SOMMAIRE

SOMMAIRE p. 1

LISTE DES ABREVIATIONS p. 7

LISTE DES FIGURES p. 11

LISTE DES TABLEAUX p. 14

INTRODUCTION GENERALE p. 16

CONTEXTUALISATION p. 20

1. Aptitude aérobie p. 21

1.1 Définition et implications dans le cadre de la santé p. 21

1.2 Déterminants de la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_{2max}$) p. 24

1.3 Adaptations cardiovasculaires à l'entraînement contribuant à l'élévation du $\dot{V}O_{2max}$ p. 28

1.3.1 Adaptations cardiaques p. 28

1.3.2 Pression artérielle et entraînement p. 29

1.3.3 *Adaptations vasculaires à l'entraînement* p. 29

1.3.4 Adaptations structurales p. 30

1.3.5 Adaptations fonctionnelles p. 32

2. Régulation de la perfusion musculaire p. 37

3. Régulation de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) p. 42

3.1 Synthèse du NO p. 42

3.1.1 Voie enzymatique à travers les NO synthases p. 42

3.1.2 Voie non enzymatique via la réduction du nitrite (NO_2^-) p. 45

3.2 Inhibition endogène du NO : implication de la diméthylarginine asymétrique (ADMA) p. 49

4. Biodisponibilité du NO dans le cadre de l'exercice p. 53

4.1 Effets de la supplémentation en nitrate (NO_3^-) dans le cadre de l'exercice p. 53

4.1.1 Effets de la supplémentation en NO_3^- sur le coût en O_2 à l'exercice p. 54

4.1.2 Effets de la supplémentation en NO_3^- sur la tolérance à l'effort p. 56

4.1.3 Effet de l'aptitude aérobie sur les propriétés ergogéniques de la supplémentation en NO_3^- p. 57

4.1.4 Effets de la supplémentation en NO_3^- sur l'exercice d'intensité supramaximale p. 59

4.2 Effets de l'ADMA dans le cadre de l'exercice p. 61

4.2.1 Effet de l'entraînement sur les niveaux de concentration d'ADMA p. 62

4.2.2 Relation entre l'ADMA et l'aptitude aérobie dans le cadre de pathologies chroniques ou de populations à risques cardiovasculaires p. 64

4.2.3 ADMA et exercice dans des populations sans pathologies chroniques p. 66

OBJECTIFS p. 68

ETUDE 1 : Effet de la supplémentation en NO_3^- sur la consommation d'oxygène au repos et au cours de l'exercice chez l'homme : revue systématique et méta-analyse p. 69

ETUDE 2 : La supplémentation en NO_3^- d'origine alimentaire n'améliore pas la tolérance à l'effort au cours d'un exercice intermittent supramaximal chez des athlètes entraînés en endurance p. 70

ETUDE 3 : Les concentrations plasmatiques d'ADMA ne sont pas associées à l'aptitude aérobie chez des sujets jeunes et sains p. 71

ETUDE 4 : L'ADMA n'affecte pas le débit sanguin musculaire lors de l'exercice chez le rat p. 72

ETUDE 1 p. 73

1. Introduction p. 74

2. Méthodes p. 75

2.1 Type d'études incluses p. 75

2.2 Type d'interventions prises en compte p. 75

2.3 Type de mesures extraites p. 77

2.4 Stratégies de recherche p. 77

2.5 Sélection des études et extraction des données p. 77

2.6 Analyse des données p. 77

3. Résultats p. 79

3.1 Etudes sélectionnées p. 79

3.2 Caractéristiques des études incluses p. 79

3.3 Risque de biais dans les études incluses p. 82

3.4 Résultats de la revue systémique p. 82

3.5 Synthèse des résultats issus de la méta-analyse p. 84

3.5.1 Taille de l'effet dans les modèles généraux p. 84

3.5.2 Analyse de sous-groupes p. 87

3.5.3 Influence des études avec les effets les plus larges p. 88

3.5.4 Biais de publication p. 89

3.5.5 Hétérogénéité et incohérence des modèles p. 89

4. Discussion p. 92

ETUDE 2 p. 94

1. Introduction p. 95

2. Méthodes p. 97

2.1 Population p. 97

2.2 Déroulement de l'étude p. 98

2.3 Epreuve d'effort maximal p. 98

2.4 Supplémentation en NO_3^- et en placebo p. 99

2.5 Exercices intermittents supramaximaux p. 99

2.6 Mesure des échanges gazeux p. 100

2.7 Oxygénation et indice de perfusion au niveau musculaire p. 100

2.8 Tension artérielle au repos p. 101
2.9 Prélèvements sanguins et mesure des NO_x plasmatiques p. 101
2.10 Analyse des données p. 101
2.11 Analyse statistique p. 102
3. Résultats p. 103
3.1 Performance à l'exercice p. 103
3.2 Echanges gazeux et fréquence cardiaque p. 104
3.3 Paramètres dérivés de la NIRS et tension artérielle de repos p. 108
3.4 Concentrations plasmatiques des NO_x p. 108
4. Discussion p. 109

ETUDE 3 p. 115

1. Introduction p. 116
2. Méthodes p. 118
2.1 Population p. 118
2.2 Déroulement de l'étude p. 118
2.3 Epreuve d'effort maximal p. 120
2.4 Mesure des échanges gazeux p. 120
2.5 Désoxygénation musculaire p. 121
2.6 Cinétique de la désoxygénation musculaire p. 122
2.7 Prélèvements sanguins p. 123
2.8 Analyse statistique p. 123
3. Résultats p. 124
3.1 Concentrations plasmatiques d'ADMA p. 124
3.2 Concentrations plasmatiques des dérivés et des rapports de la L-arginine p. 126
3.3 Désoxygénation musculaire p. 126
4. Discussion p. 130

ETUDE 4 p. 133

1. Introduction p. 134
2. Méthodes p. 136
2.1 Animaux p. 136

2.2 Procédures à l'exercice p. 136
2.3 Procédure chirurgicale p. 137
2.4 Détermination du débit sanguin régional p. 138
2.4.1 Injection des microsphères p. 138
2.4.2 Analyse des microsphères p. 139
2.4.3 Estimation du débit cardiaque régional p. 139
2.5 Injection du 2-NBDG p. 140
2.6 Prélèvements tissulaires p. 140
2.7 Analyse des données p. 141
2.8 Protocole envisagé pour la détermination de la captation du glucose p. 141
3. Résultats p. 143
3.1 Perfusion musculaire à l'exercice p. 143
3.2 Captation musculaire du glucose à l'exercice p. 143
4. Discussion p. 147

DISCUSSION GENERALE p. 150

CONCLUSION ET PERSPECTIVES p. 157

REFERENCES p. 160

LISTE

DES

ABREVIATIONS

ACh : acétylcholine

ADMA : diméthylarginine asymétrique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AGXT 2 : alanine-glyoxylate aminotransférase 2

Akt : protéine kinase B

ATP : adénosine triphosphate

AUC : aire sous la courbe

BH_4 : tétrahydrobioptérine

Ca^{2+} : calcium

CATs : transporteurs d'acides aminés cationiques

cGMP : guanosine monophosphate cyclique

CO_2 : dioxyde de carbone

DDAH : Diméthylaminohydrolase diméthylarginine

DMGV : l'alpha-keto-delta-(N^G, N^G-diméthylguanidine) acide valérique

EDL : muscle du extensor digitorum longus

eNOS : NO synthase endothéliale

FAD : flavine adénine dinucléotide

FMD : dilatation dépendante du débit sanguin

FMN : flavine mononucléotide

GTN : nitroglycérine

Hb : l'hémoglobine

HbO_2 : oxyhémoglobine

HHb : désoxyhémoglobine

IMC : Indice de masse corporelle

iNOS : NOS inductible

ki : constante d'inhibition

Km : constante de Michaelis

LDL : lipoprotéines de faible densité

L-NMMA : N-monométhyl-L-arginine

Mb : myoglobine

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (sous forme oxydée)

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (sous forme réduite)

$NaNO_3^-$: sels de nitrate

NIRS : spectroscopie du proche infrarouge

nNOS : NO synthase neuronale

NO : monoxyde d'azote

NO_2^- : nitrite

NO_3^- : nitrate

NO_x : oxydes d'azote

O_2 : oxygène

O_2^- : anion superoxyde

$ONOO^-$: peroxynitrite

PCr : créatine phosphate

Pi : phosphate inorganique

PKD : polykystose rénale autosomique dominante

PmO_2 : pression intramusculaire en O_2

PRMTs : protéines arginine méthyltransférases

QR : quotient respiratoire

SDMA : diméthylarginine symétrique

SMTC : S-Methyl-L-thiocitrulline

THb : hémoglobine totale

$\dot{V}CO_2$: production de dioxyde de carbone

$\dot{V}O_2$: consommation d'oxygène

$\dot{V}O_{2max}$: consommation maximale d'oxygène

$\dot{V}O_{2ST}$: consommation d'oxygène au premier seuil ventilatoire

$\dot{V}E$: ventilation

LISTE

DES

FIGURES

FIGURE 1. Les mécanismes physiologiques induisant une altération de la fonction endothéliale à travers une réduction de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) p. 19

FIGURE 2. Structure et activité catalytique de la NO synthase (NOS) p. 44

FIGURE 3. La circulation entero-salivaire du nitrate chez l'homme p. 48

FIGURE 4. Procédure de sélection de la recherche dans la littérature scientifique p. 80

FIGURE 5. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité sous-maximale à la suite de la supplémentation en NO_3^- p. 82

FIGURE 6. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité modérée à la suite de la supplémentation en NO_3^- p. 83

FIGURE 7. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité élevée à la suite de la supplémentation en NO_3^- p. 84

FIGURE 8. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité difficile à la suite de la supplémentation en NO_3^- p. 84

FIGURE 9. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité maximale à la suite de la supplémentation en NO_3^- p. 85

FIGURE 10. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ en condition de repos à la suite de la supplémentation en NO_3^- p. 85

FIGURE 11. Résumé des effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ p. 90

FIGURE 12. Nombre individuel de répétitions complétées avant l'épuisement au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale à la suite d'une supplémentation en jus betterave rouge et le placebo p. 102

FIGURE 13. Variables du $\dot{V}O_2$ (A) et du $\dot{V}CO_2$ (B) au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale après le placebo et la supplémentation en jus de betterave rouge p. 103

FIGURE 14. Variables du $\dot{V}E$ (A) et de la fréquence cardiaque (B) au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale après le placebo et la supplémentation en jus de betterave rouge p. 104

FIGURE 15. Profil de la désoxygénation musculaire au cours de l'épreuve d'effort maximal, estimée chez des sujets représentatifs du groupe LO-FIT et du groupe HI-FIT p. 121

FIGURE 16. Concentrations plasmatiques de l'ADMA, de la L-arginine et des rapports de dérivés de la L-arginine, Arginine/ADMA et Homoarginine/ADMA, pour les groupes LO-FIT et HI-FIT avant et après l'épreuve d'effort maximal p. 124

FIGURE 17. Concentrations plasmatiques de la SDMA, de la Homoarginine et de la Citrulline pour les groupes LO-FIT et HI-FIT avant et après l'épreuve d'effort maximal p. 126

FIGURE 18. Perfusion musculaire à la fin de l'exercice dans les muscles ayant une prédominance de fibres musculaires de type 1 suivant les trois conditions de traitement (ADMA, ADMA + SMTC, et Saline) p. 143

FIGURE 19. Perfusion musculaire à la fin de l'exercice les muscles ayant une prédominance de fibres musculaires de type 2 suivant les trois conditions de traitement (ADMA, ADMA + SMTC, et Saline) p. 144

LISTE

DES

TABLEAUX

TABLEAU 1. Critères utilisés pour déterminer le domaine d'intensité de l'exercice p. 75

TABLEAU 2. Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude 2 (n=9) p. 96

TABLEAU 3. Effets d'une supplémentation en jus de betterave rouge sur les paramètres des échanges gazeux et la fréquence cardiaque au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale p. 105

TABLEAU 4. Effets d'une supplémentation de jus de betterave rouge de 3 jours sur la fréquence cardiaque de repos et la tension artérielle p. 107

TABLEAU 5. Effets d'une supplémentation en jus de betterave rouge de 3 jours sur les paramètres dérivés de la spectroscopie du proche infrarouge et mesurés au niveau du vaste latéral au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale p. 108

TABLEAU 6. Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude 3 p. 118

TABLEAU 7. Concentrations plasmatiques de l'ADMA et des dérivés de la L-arginine pour les groupes LO-FIT et HI-FIT avant et après l'épreuve d'effort maximal p. 123

TABLEAU 8. Associations des concentrations plasmatiques de l'ADMA et des dérivés de la L-arginine avec le $\dot{V}O_{2max}$ et les paramètres estimés à partir de la modélisation sigmoïde de la désoxygénation musculaire p. 127

TABLEAU 9. Paramètres de l'ajustement de la modélisation et variables dérivées du modèle sigmoïde de la désoxygénation musculaire mesurée au cours de l'épreuve d'effort maximal p. 128

TABLEAU 10. Perfusion musculaire à la fin de l'exercice mesurée au niveau des muscles des membres postérieurs chez des rats ayant suivi les 3 conditions expérimentales (ADMA, ADMA + SMTC, Saline) p. 145

INTRODUCTION

La mesure de la consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_{2max}$) est le critère le plus unanimement admis pour évaluer l'aptitude aérobie. Le $\dot{V}O_{2max}$ est à la fois l'un des principaux facteurs prédictifs de la tolérance à l'exercice (Bassett et Howley 2000), des risques cardiovasculaires (Williams 2001) et de la mortalité toutes causes confondues (Myers et al. 2002). Le $\dot{V}O_{2max}$ est largement déterminé par l'augmentation du débit cardiaque, puis du débit sanguin musculaire (Bassett et Howley 2000). Au niveau vasculaire, les phénomènes de vasodilatation et vasoconstriction prennent place au niveau de l'endothélium, fine couche tissulaire recouvrant la paroi interne des vaisseaux sanguins. L'endothélium est également impliqué activement dans le processus d'athérosclérose, qui constitue une étape précoce du développement de pathologies cardiovasculaires (McLenachan et al. 1991; Cooke 2004). L'endothélium sécrète en réponse à divers stimuli le monoxyde d'azote (NO), agent vasodilatateur le plus puissant de l'organisme (Cooke 2004). En outre, le NO est un agent anti-athérosclérotique puisqu'il contribue au maintien de la fonction endothéliale, notamment en inhibant l'adhésion et l'agrégation plaquettaire d'une part, l'adhésion des leucocytes d'autre part, et enfin en bloquant la prolifération des cellules musculaires lisses (Cooke 2004). Ainsi, l'évaluation de la vasodilatation dépendante du NO participe au diagnostic et au suivi des personnes présentant des risques cardiovasculaires. Les mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale en raison d'une diminution de la biodisponibilité du NO sont présentés dans la Figure 1.

Le NO est synthétisé majoritairement par une voie enzymatique, par la NO synthase (NOS) qui est exprimée sous 3 isoformes différentes : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS) (Levine et al. 2012). La synthèse du NO nécessite la présence de co-facteurs enzymatiques, mais est principalement dépendante de la disponibilité en oxygène et en L-arginine, son précurseur. La production du NO peut également être régulée par la présence d'un inhibiteur endogène, la diméthylarginine asymétrique (ADMA), dont les concentrations plasmatiques sont jusqu'à 9 fois plus élevées chez des patients souffrant de pathologies cardiovasculaires et métaboliques comparativement à des sujets sains (Böger 2006). L'ADMA est synthétisée par les protéines arginine méthyltransférases (PRMTs), à travers la méthylation de protéines intracellulaires fixant la L-arginine (Achan et al. 2003). Elle est ensuite libérée par l'hydrolyse de ces protéines (Achan et al. 2003). L'ADMA est dégradée par voie enzymatique, via la Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH) à hauteur de 90 %, et par excrétion rénale pour le reste (Blackwell 2010). L'ADMA est négativement associée à la vasodilatation dépendante de

l'endothélium (Böger et al. 1998), et se présente ainsi, comme un marqueur de risque dans la survenue de pathologies cardiovasculaires (Böger 2006).

Par ailleurs, l'importance d'une voie alternative de synthèse du NO ayant pour origine les apports exogènes en nitrates a été mise en évidence ces dernières années (Gladwin et al. 2005). Le nitrate (NO_3^-) d'origine endogène est issu de l'oxydation du NO par l'oxyhémoglobine, et était considéré antérieurement comme un simple marqueur de production de NO. Toutefois, il a été démontré que le NO_3^- ingéré est capté par les glandes salivaires, afin d'être concentré et réduit dans la cavité buccale en nitrite (NO_2^-) par des bactéries séjournant sur la langue. Une fois réduit dans la cavité buccale, le NO_2^- formé atteint l'estomac, où il est réduit en NO ou autres espèces dérivées de l'azote, par le milieu acide de l'estomac (Lundberg et al. 2008). Puis, le NO_2^- non réduit et le NO oxydé sont libérés et rejoignent la circulation sanguine (Lundberg et al. 2008). Au niveau vasculaire et tissulaire, le NO_2^- peut être réduit en NO, via la réaction avec la désoxyhémoglobine et la désoxymyoglobine, respectivement (Lundberg et al. 2008). La supplémentation en nitrate d'origine alimentaire apparaît ainsi comme un moyen non pharmacologique d'augmenter la biodisponibilité du NO. Ceci constitue une perspective particulièrement attractive à la fois dans des conditions pathologiques, où une réduction de la biodisponibilité du NO peut induire une limitation de l'apport et de l'utilisation de l'oxygène aux muscles actifs, et pour les populations sportives souhaitant augmenter la capacité de transport de l'oxygène dans un but de performance.

Par conséquent, cette thèse a pour objet d'étudier les points suivants :

- **la modulation de la biodisponibilité du NO par l'inhibition de sa synthèse par l'ADMA, ou par l'augmentation des apports exogènes en NO_3^-;**

- **les répercussions de la modulation de la biodisponibilité du NO dépendante de l'action de l'ADMA ou des supplémentations en NO_3^- sur la perfusion musculaire ;**

- **l'influence de l'aptitude aérobie sur la relation entre la perfusion musculaire et les facteurs pouvant réguler la biodisponibilité du NO.**

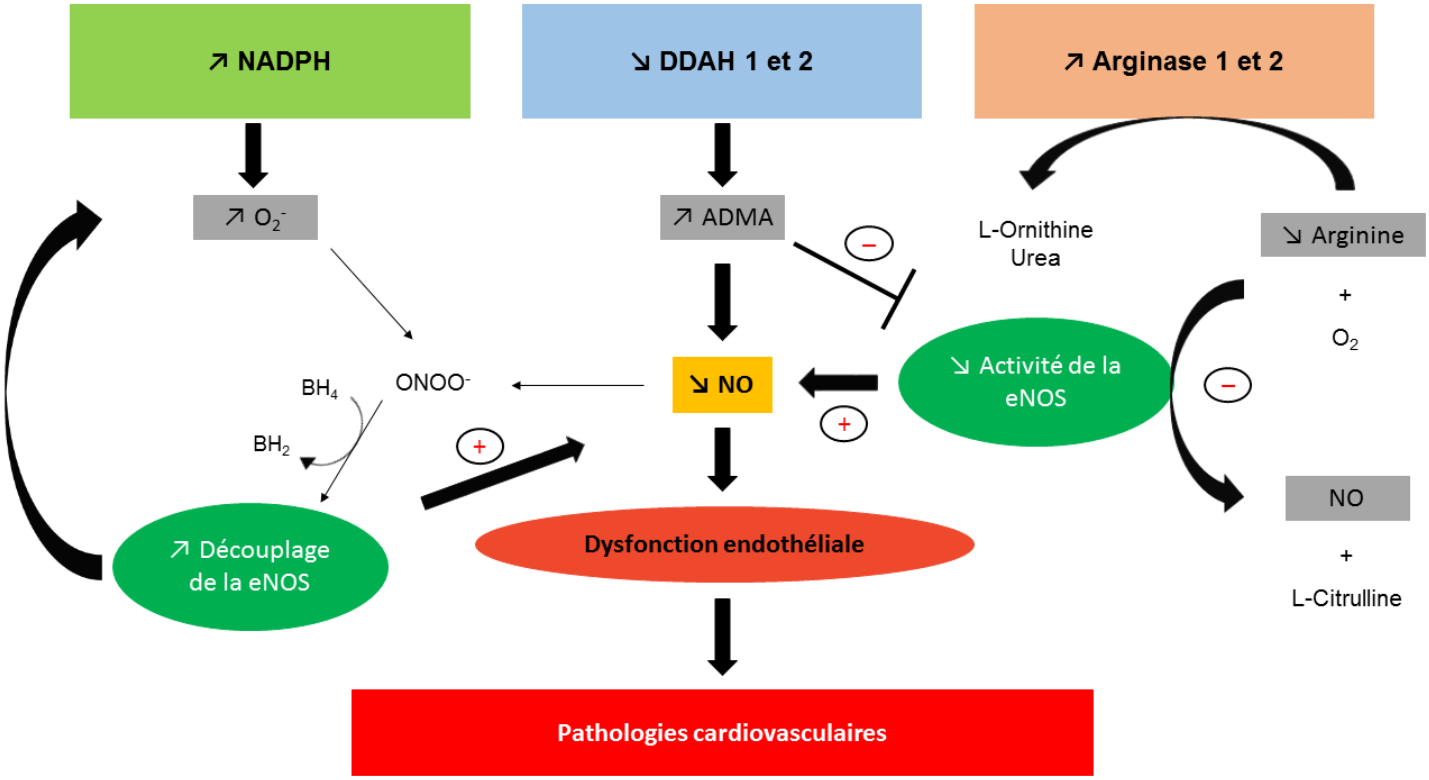


FIGURE 1. Les mécanismes physiologiques induisant une altération de la fonction endothéliale à travers une réduction de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO)

Une stimulation de la NADPH génère des anions superoxydes (O_2^-), lesquels réagissent rapidement avec le NO et forment l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$). L'$ONOO^-$ formé oxyde le co-facteur de la NO synthase endothéliale (eNOS), la tétrahydrobioptérine (BH_4) en dihydrobioptérine (BH_2), conduisant au découplage de la eNOS. Une fois découplée, cette dernière produit de l'O_2^- en lieu et place du NO, réduisant ainsi la biodisponibilité du NO. Une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la diméthylaminohydrolase diméthylarginine (DDAH), l'enzyme responsable de la dégradation de la diméthylarginine asymétrique (ADMA), induit une augmentation significative des concentrations extra- et intra-cellulaires de l'ADMA. Cette dernière inhibe directement l'activité de la eNOS de façon dose dépendante et atténue également l'entrée dans la cellule de la L-arginine, le précurseur endogène de la eNOS. L'excès d'ADMA dans les parois vasculaires renforce la génération d'O_2^-, lequel réduit la biodisponibilité du NO en l'inactivant à travers sa réaction avec le NO. Une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de l'arginase conduit à une diminution de la biodisponibilité du NO en raison de la compétition entre la eNOS et l'arginase dans l'utilisation de la L-arginine. L'arginase utilise la L-arginine pour catalyser la réaction formant la L-ornithine et l'urée. Cette réaction favorise la génération d'O_2^- qui diminue la biodisponibilité du NO en oxydant le co-facteur BH_4 et en augmentant la formation endogène de méthylarginines comme l'ADMA. L'ensemble de ces altérations entraîne une dysfonction endothéliale à travers une réduction des réponses physiologiques dépendantes du NO. La dysfonction endothéliale est une étape précoce dans la survenue des pathologies cardiovasculaires. La figure ci-dessus a été adaptée à partir de Chen et al. (2018) et de El Assar et al. (2016).

CONTEXTUALISATION

1. Aptitude aérobie

1.1 Définition et implications dans le cadre de la santé

L'aptitude aérobie est définie comme la capacité d'un individu à resynthétiser l'adénosine triphosphate (ATP) par l'intermédiaire de la filière aérobie afin de répondre à la dépense énergétique lors de l'exercice (Jones et Carter 2000). Elle est généralement estimée par la mesure du $\dot{V}O_{2max}$ (Bassett et Howley 2000) et constitue l'un des facteurs majeurs dans la tolérance à l'effort (Bassett et Howley 1997). Le $\dot{V}O_{2max}$ dépend de facteurs centraux cardio-respiratoires et de facteurs périphériques vasculaires et musculaires (Whipp et al. 1982), lesquelles s'organisent pour soutenir l'apport et l'utilisation de l'oxygène (O_2) aux muscles squelettiques (Saltin et Strange 1992). Par ailleurs, le $\dot{V}O_{2max}$ est également impliqué dans la santé. Elle est à la fois l'un des principaux facteurs prédictifs des risques cardiovasculaires (Williams 2001) et de la mortalité toutes causes confondues (Myers et al. 2002).

Les facteurs génétiques contribuent à la variabilité des valeurs de $\dot{V}O_{2max}$ observée dans des populations sédentaires (Bouchard et al. 1998). L'étude HERITAGE Family, qui explorait la ressemblance familiale de $\dot{V}O_{2max}$ chez des parents et leurs descendants sédentaires, a mis en évidence une variabilité près de 3 fois plus importante entre les familles incluses dans l'étude qu'entre les membres d'une même famille (Bouchard et al. 1998). Ainsi, l'héritabilité maximale liée aux facteurs génétiques est estimée à environ 50% pour le $\dot{V}O_{2max}$, après ajustement pour l'âge, la masse corporelle, la masse maigre et la masse grasse (Bouchard et al. 1998).

Ces facteurs génétiques pourraient contribuer à expliquer que l'aptitude aérobie est un facteur ayant un pourvoir prédictif supérieur à celui de l'activité physique dans la survenue d'événements cardiovasculaires. Dans une méta-analyse comprenant 23 cohortes relevant à la fois l'activité physique et l'aptitude aérobie, la réduction du risque de pathologies cardiovasculaires est significativement plus importante chez les sujets ayant le niveau d'aptitude aérobie le plus élevé que chez ceux ayant le niveau d'activité physique le plus élevé (Williams 2001). Ce résultat s'expliquait par une chute accrue du risque de pathologies cardiovasculaires après le 25ème percentile dans la distribution des niveaux d'aptitude aérobie (Williams 2001). Dans le cadre de suivis longitudinaux de patients, l'aptitude aérobie apparait comme un facteur prédictif plus important de la mortalité générale que le niveau d'activité physique hebdomadaire, ou que d'autres facteurs de risque établis tels que l'obésité, le diabète,

l'hypertension ou le tabagisme (Myers et al. 2004). Le rôle intrinsèque de l'aptitude aérobie dans le maintien de la santé, à travers une réduction de la survenue de pathologies chroniques, a également été confirmé dans des modèles expérimentaux chez l'animal. Koch et Britton ont effectué une sélection génétique de rats sur plusieurs générations en se basant sur un seul trait de sélection, l'aptitude aérobie (Koch et Britton 2001). Après 35 générations de rats, le groupe de faible aptitude aérobie présentait une distance maximale de course de 205 m contre 2 293 m pour le groupe d'aptitude aérobie élevée (Garton et al. 2016). L'estimation de l'héritabilité maximale pour la distance de course était similaire entre les deux groupes sur les 28 premières générations, suggérant que les facteurs génétiques peuvent prédisposer à un niveau faible ou élevé d'aptitude aérobie chez l'individu (Ren et al. 2013). L'approche intéressante de ce type d'études a également été de mettre en lien les phénotypes de survenue de pathologies cardiovasculaires, métaboliques et l'aptitude aérobie au cours des générations successives d'animaux. Ainsi dès la 10ème génération, les rats ayant une faible aptitude aérobie présentaient une augmentation des risques cardiovasculaires caractérisé par l'augmentation de l'adiposité viscérale, de la pression artérielle, l'apparition d'une dyslipidémie, de la dysfonction endothéliale et de l'insulino-résistance (Wisløff et al. 2005). L'ensemble de ces résultats supporte le rôle central de l'aptitude aérobie dans la réduction des risques de pathologies chroniques cardiovasculaires et métaboliques.

Les différences interindividuelles du niveau d'aptitude aérobie peuvent être également sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la pratique d'une activité physique. Ainsi, dans l'étude HERITAGE Family, la corrélation significative du $\dot{V}O_{2max}$ des conjoints indique que des facteurs non génétiques contribuent à la ressemblance familiale de l'aptitude aérobie (Bouchard et al. 1998). Chez l'animal, des rats issus de lignées avec une faible aptitude aérobie soumis à un programme d'entraînement améliore le phénotype à risque de ces animaux. Après 8 semaines d'entraînement, la fonction cardiaque des rats présentant une faible aptitude aérobie était améliorée et atteignait celle des rats sédentaires ayant intrinsèquement une aptitude aérobie élevée (Høydal et al. 2007). Cette amélioration était accompagnée d'une augmentation de leur $\dot{V}O_{2max}$ à hauteur de 45 % contre 39 % pour des rats suivant le même entraînement mais disposant d'une aptitude aérobie initiale élevée (Høydal et al. 2007). Les différences intrinsèques entre les groupes dépendent de la biodisponibilité du NO (Høydal et al. 2007). En outre, à la 15ème génération de rats présentant intrinsèquement une faible aptitude aérobie, leur phénotype similaire à un syndrome métabolique était amélioré après un entraînement intermittent de 8 semaines à une intensité difficile (Haram et al. 2009). Une large augmentation

de leur $\dot{V}O_{2max}$ (+ 45 %) était également observée alors que leur fonction endothéliale progressait à travers une élévation de l'expression et de l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS), enzyme responsable de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) au niveau vasculaire (Haram et al. 2009). Cette augmentation de la production du NO pouvait être un facteur expliquant l'amélioration simultanée de l'aptitude aérobie et du profil métabolique chez les rats entraînés. Par ailleurs, au cours de ce processus de sélection des rats, le $\dot{V}O_{2max}$ se démarque comme le facteur le plus prédictif dans l'espérance de vie de ces derniers (comparativement à la distance de course maximale), et ce indépendamment du niveau d'aptitude aérobie intrinsèque (Koch et al. 2011).

Toutefois, même si le niveau d'activité physique et le statut d'entraînement déterminent dans une certaine mesure le $\dot{V}O_{2max}$, des données expérimentales supportent l'idée que l'aptitude aérobie est un facteur plus déterminant que le niveau d'activité physique, seul. Après un entraînement de 20 semaines à une intensité de modérée à élevée sur une population de 481 individus, une hétérogénéité dans le gain de $\dot{V}O_{2max}$ apparaît, avec la présence respective de répondeurs ($\dot{V}O_{2max}$ augmenté jusqu'à 1,0 $L.min^{-1}$ post-entraînement) et de non-répondeurs (faible ou absence de changement au niveau du $\dot{V}O_{2max}$ post-entraînement) (Bouchard et al. 1999). Chez l'animal, des modèles ont été développés à travers la sélection et la reproduction de rats, le critère de sélection se basait sur le gain de distance de course en réponse à un entraînement en endurance. À la 7ème génération, les rats répondeurs à un entraînement en endurance de 8 semaines ont une distance de course augmentée à hauteur de 46 % alors que les rats considérés comme non-répondeurs ont une perte de 2 % de leur capacité à la course (Koch et al. 2013; Wisløff et al. 2015). À ce même stade générationnel, des rats sélectionnés en tant que répondeurs et non-répondeurs à l'exercice prenaient part à un entraînement intermittent de 8 semaines à une intensité difficile (Wisløff et al. 2015). Les rats dans le groupe des répondeurs avaient une augmentation de 40 % de leur $\dot{V}O_{2max}$ tandis qu'aucun changement à la suite de l'entraînement n'était observé chez les rats appartenant au groupe des non-répondeurs (Wisløff et al. 2015). À la 15ème génération, les rats considérés comme non-répondeurs à l'exercice présentaient un phénotype similaire au syndrome métabolique avec notamment une insulino-résistance et une adiposité accrue en condition de sédentarité (Lessard et al. 2013). Comme attendu, ces rats non-répondeurs n'avaient pas d'augmentation de leur capacité à la course à la suite d'un entraînement en endurance de 8 semaines (Lessard et al. 2013). Dans ce même modèle, la capacité mitochondriale des rats non-répondeurs était intacte et répondaient normalement à l'entraînement en endurance

comparativement au groupe de rats répondeurs (Lessard et al. 2013). Ainsi, une altération de la fonction mitochondriale dans ce modèle ne pouvait expliquer la dysfonction métabolique et la réduction de l'aptitude aérobie. Ces résultats suggèrent que des altérations au niveau cardiovasculaire pourraient être responsables du lien entre l'aptitude aérobie et le risque de comorbidité et de mortalité.

En conclusion, l'aptitude aérobie apparaît comme un facteur indépendant dans la détermination du risque de pathologies cardiovasculaires, de désordres métaboliques et la prédiction de la mortalité, toutes causes confondues. Les associations rapportées entre l'aptitude aérobie et l'état de santé à la fois chez l'homme et l'animal semblent étayer la théorie selon laquelle, le métabolisme aérobie serait un point de démarcation central entre Santé et Maladie. Selon l'hypothèse du transfert d'énergie ou de l'aérobie, tout au long de leur évolution, les organismes vivants s'organiseraient de façon complexe afin d'obtenir une capacité importante de dissipation de l'énergie pouvant permettre la conversion de l'énergie produite en mouvements (Koch et Britton 2008). Ainsi, l'aptitude aérobie reflétée par le $\dot{V}O_{2max}$ *pourrait être le résultat de cette organisation complexe, et procurerait à l'organisme une résistance à la survenue de pathologies chroniques (Koch et al. 2012; Garton et al. 2016). Il est donc primordial de connaître d'une part les facteurs limitant le* $\dot{V}O_{2max}$ *dans l'organisme, et d'autre part les adaptations physiologiques découlant tout particulièrement de l'entraînement en endurance, et permettant d'augmenter l'aptitude aérobie à travers notamment une élévation du* $\dot{V}O_{2max}$.

1.2 Déterminants du $\dot{V}O_{2max}$

Plusieurs étapes sont impliquées dans le transport de l'O_2 de l'atmosphère à la mitochondrie au sein du muscle squelettique, de sorte que ces dernières peuvent être toutes des facteurs physiologiques limitant le $\dot{V}O_{2max}$. Nous pouvons les lister comme suit : la capacité de diffusion pulmonaire ; le débit cardiaque maximal ; la capacité de transport de l'O_2 au niveau du sang ; les fonctions oxydatives du muscle squelettique (Bassett et Howley 2000). Les limitations du $\dot{V}O_{2max}$ associées au débit cardiaque maximal se traduisent par une diminution d'apport en O_2 au muscle squelettique. Une diminution de l'apport en O_2 au muscle squelettique est susceptible d'induire une réduction de la pression intramusculaire en O_2 (PmO_2) durant l'exercice, où la demande métabolique peut excéder de 20 fois celle de repos dans les muscles

actifs au cours d'un effort d'intensité maximale (Weibel et Hoppeler 2005). L'élévation du débit cardiaque, assurant l'apport en O_2 au niveau du muscle squelettique, est régulée au cours de l'exercice par l'augmentation du débit sanguin musculaire et le retour veineux au cœur (Bada et al. 2012). Ce mécanisme de régulation semble être maintenu indépendamment du statut d'entraînement. Le débit cardiaque reste couplé à la demande métabolique des muscles actifs durant l'exercice après un entraînement de 5 semaines d'extension de la jambe, mettant ainsi en évidence que la réponse cardiovasculaire à l'exercice est régulée en partie par des adaptations périphériques lors d'un entraînement mobilisant une large masse musculaire (Mortensen et al. 2013). L'ensemble de ces résultats supportent l'étroite corrélation (r = 0,98) entre l'apport en O_2 et la demande métabolique observée lors d'exercices d'extension de la jambe (Andersen et Saltin 1985). Dans cette étude, la population était jeune et saine et la modalité d'exercice n'engageait qu'une faible masse musculaire, rendant ainsi l'apport en O_2 non limité par le débit sanguin musculaire (Andersen et Saltin 1985). Nous allons maintenant aborder plus précisément les facteurs physiologiques limitant le $\dot{V}O_{2max}$ en perspective d'une réduction de l'apport en O_2.

Au cours de l'exercice, le système pulmonaire n'est pas considéré comme un facteur limitant le $\dot{V}O_{2max}$ chez la plupart des individus. La capacité du système pulmonaire est généralement suffisante pour répondre à la demande relative à l'augmentation de la ventilation et des échanges gazeux à l'exercice. En effet, la réponse ventilatoire est en mesure de compenser une différence accrue de pression en O_2 entre les compartiments alvéolaire et capillaire même à des intensités d'exercice difficile et maximale (> à 85 % de $\dot{V}O_{2max}$) (Amann 2012). Toutefois, dans certains contextes, des limites au niveau du système respiratoire peuvent apparaître. Chez des sujets entraînés ($\dot{V}O_{2max}$= 70,1 mL.min^{-1}.kg^{-1}) présentant une hypoxémie induite par l'exercice, une augmentation de la fraction en O_2 inspirée conduisait à une élévation de la SaO_2 et du $\dot{V}O_{2max}$ durant une épreuve d''effort maximal, respectivement (Powers et al. 1989). A contrario, chez les sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ moyen de 56,5 mL.min^{-1}.kg^{-1} et ne présentant pas d'hypoxémie induite par l'exercice, aucune augmentation du $\dot{V}O_{2max}$ n'était rapportée sous condition d'hyperoxie durant épreuve d'effort maximal (Powers et al. 1989).

Seules les populations d'athlètes avec des $\dot{V}O_{2max}$ élevés semblent sujettes à des limitations liées à la ventilation pulmonaire. Chez certains athlètes, une réduction de la pression partielle en O_2 au niveau artériel peut être observée au cours d'exercices d'intensité sous-maximale (Amann 2012). Ce phénomène laisse supposer que le système pulmonaire est en

mesure de limiter l'apport en O_2 alors même que les capacités respiratoires maximales ne sont pas atteintes pour répondre aux besoins de transport en O_2. En support de cette limite sous-maximale, le système pulmonaire peut également limiter l'apport en O_2 indépendamment de son rôle dans la saturation artérielle. Une altération de la réponse ventilatoire, pour des exercices d'intensité supérieure à 85 % du $\dot{V}O_{2max}$ augmente la contribution des muscles respiratoires lors des phases expiratoires et inspiratoires (Amann 2012). Ce travail accru entraîne une accumulation de métabolites au sein des muscles respiratoires qui pourrait stimuler les afférences de type IV (Murphy et al. 2011). Après le traitement de ces afférences dans les centres de contrôle du système cardiovasculaire, l'activité sympathique pourrait être augmentée, induisant ainsi une vasoconstriction sympathique dans les muscles actifs au cours de l'exercice (Murphy et al. 2011). Le système pulmonaire peut donc contraindre également l'apport en O_2, via une réduction de la proportion de débit cardiaque distribuée aux muscles locomoteurs, lors de l'exercice.

Cette compétition entre les muscles respiratoires et locomoteurs est par ailleurs connue comme étant un facteur aggravant des limitations cardiaques dans le cadre de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque. Chez les patients avec une insuffisance cardiaque, la proportion du débit cardiaque orienté vers les muscles respiratoires est augmentée en réponse à l'hyperventilation chronique et à la stimulation de la vasoconstriction sympathique au niveau des muscles locomoteurs (Poole et al. 2012). Cette vasoconstriction sympathique est exacerbée chez ces patients par une altération de la biodisponibilité du NO, qui est l'un des principaux médiateurs de la sympatholyse (Thomas et al. 2001). De fait, une altération de la biodisponibilité du NO et d'autres agents impliqués dans la vasodilatation peut amplifier la diminution de l'apport en O_2 aux muscles actifs, dans le contexte d'une hyperventilation (Poole et al. 2012).

Le facteur physiologique majeur limitant le $\dot{V}O_{2max}$ est le débit cardiaque maximal en raison d'une conductance vasculaire périphérique pouvant largement excéder la capacité de pompage du cœur. Le débit cardiaque maximal expliquerait jusqu'à 85 % des limitations du $\dot{V}O_{2max}$ (Bassett et Howley 2000). L'ampleur de cette limitation est confirmée lorsque la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$) et le débit sanguin musculaire au niveau des membres supérieurs et inférieurs sont mesurés et comparés simultanément, au cours d'efforts maximaux de pédalage mobilisant à la fois les bras et les jambes (Boushel et al. 2011). Dans cette étude, une biopsie était réalisée au niveau des muscles vaste latéral et deltoïde, afin de mesurer la

capacité respiratoire mitochondriale maximale ex vivo chez les sujets. Au cours de l'exercice sur bicyclette engageant approximativement la moitié de la masse musculaire du corps entier, le $\dot{V}O_{2max}$ in vivo des membres inférieurs était réduit de 36 % comparativement à la capacité respiratoire mitochondriale maximale au niveau du vaste latéral. A contrario, le $\dot{V}O_{2max}$ in vivo des membres supérieurs durant un exercice de pédalage, sollicitant le haut du corps, coïncidait avec la capacité respiratoire mitochondriale maximale mesurée ex vivo au niveau du deltoïde. Ces résultats s'accompagnaient d'un débit sanguin musculaire supérieur de 34 % dans les membres supérieurs, comparativement aux membres inférieurs. Ainsi, l'apport en O_2 est un facteur limitant le $\dot{V}O_{2max}$ lorsqu'une large proportion ($\geq$ 50 %) de la masse musculaire est engagée à l'exercice (Boushel et al. 2011).

En conclusion, le $\dot{V}O_{2max}$ est limité par la capacité de l'organisme à délivrer l'O_2 en réponse à la demande métabolique des muscles actifs lors d'exercices mobilisant une proportion importante de la masse musculaire totale. Le débit cardiaque maximal est ainsi le facteur physiologique majeur dans les limitations impactant le $\dot{V}O_{2max}$. Le débit sanguin musculaire et le retour veineux contribuent à l'élévation du débit cardiaque à l'exercice, permettant ainsi d'ajuster étroitement l'apport et l'utilisation de l'O_2. L'influence centrale dans la détermination du $\dot{V}O_{2max}$ semble être également confirmée à travers les modèles étudiant l'aptitude aérobie intrinsèque chez animal. Après 15 générations de sélection, les rats présentant une capacité à la course élevée avaient un $\dot{V}O_{2max}$ supérieur par rapport à celui mesuré chez les rats ayant une capacité à la course faible (Gonzalez et al. 2006). Cet $\dot{V}O_{2max}$ supérieur était associé à un taux accru d'O_2 délivré aux muscles squelettiques à l'exercice (Gonzalez et al. 2006). Toutefois, la quantité d'O_2 extraite en proportion de son apport était similaire entre les rats indépendamment de leur niveau d'aptitude aérobie, suggérant ainsi que l'augmentation de l'extraction totale en O_2 chez les rats ayant une capacité à la course élevée était compensée par un débit sanguin musculaire accru. Au vu de ces différents éléments. Il est donc prépondérant d'aborder les adaptations physiologiques au niveau du système vasculaire menant à une augmentation de l'apport en O_2 aux muscles, celui-ci déterminant majoritairement le métabolisme aérobie à l'exercice.

1.3 Adaptations cardiovasculaires à l'entraînement contribuant à l'élévation du $\dot{V}O_{2max}$

1.3.1 *Adaptations cardiaques*

Le débit cardiaque est déterminé par le produit de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique. Le débit cardiaque augmente dès le début de l'exercice et de façon linéaire afin de répondre aux besoins métaboliques des muscles actifs (Mortensen et al. 2005). Le débit cardiaque chez des sujets sains et jeunes est en moyenne de ≈ 25 $L.min^{-1}$ (Mortensen et al. 2008) et peut atteindre jusqu'à 35 à 40 $L.min^{-1}$ chez des athlètes masculins au cours d'un exercice maximal sur ergocycle (Ekblom et Hermansen 1968). La nette augmentation du débit cardiaque maximal chez les sujets entraînés résulte d'adaptations structurales et fonctionnelles au niveau du cœur, qui se traduisent par une élévation du volume d'éjection systolique maximal. La fréquence cardiaque maximale est en revanche inchangée suite à l'entraînement (Hellsten et Nyberg 2015).

Les marqueurs qui définissent le « cœur d'athlète » sont les suivants : une augmentation du volume des ventricules gauche et droit à la fin de la diastole ; une hypertrophie du ventricule gauche ; une augmentation de la masse du ventricule gauche et du volume de l'oreillette droite (Hellsten et Nyberg 2015). Alors que la plupart des comparaisons ont été réalisées lors d'études transversales, le remodelage cardiaque a également été rapporté lors de suivis longitudinaux. Chez des sujets jeunes et sains non préalablement entraînés, un programme d'entraînement en endurance de 6 mois, à raison de 3 séances/semaine, augmentait la masse du ventricule gauche, le volume du ventricule gauche à la fin de la diastole, et l'épaisseur de la paroi inter-ventriculaire (Spence et al. 2011). Ce remodelage du ventricule gauche était accompagné d'une élévation du $\dot{V}O_{2max}$ de 3,5 $L.min^{-1}$ à 3,8 $L.min^{-1}$ (Spence et al. 2011).

D'un point de vue fonctionnel, la large augmentation du volume d'éjection systolique après l'entraînement en endurance est principalement liée à un accroissement du volume du ventricule gauche à la fin de la diastole (Hellsten et Nyberg 2015). Cette expansion du volume du ventricule gauche à la fin de la diastole est majoritairement déterminée par un remplissage plus précoce et plus rapide du ventricule gauche au cours de la diastole (Ferguson et al. 2001; Baggish et al. 2010), ainsi qu'un accroissement de la compliance et de la distensibilité cardiaques (Levine et al. 1991).

En conclusion, l'ensemble de ces adaptations cardiaques contribuent à améliorer la fonction cardiaque, en augmentant le débit cardiaque maximal, à travers une élévation du volume d'éjection systolique, afin de supporter le besoin en O_2 du métabolisme aérobie au cours de l'exercice.

1.3.2 *Pression artérielle et entraînement*

Au travers d'une méta-analyse, il a été rapporté que l'entraînement en endurance induit une réduction de la pression artérielle mesurée au repos ou en ambulatoire sur 24h, en raison d'une diminution de la résistance vasculaire systémique, chez des sujets hypertendus et sains sédentaires (Cornelissen et Fagard 2005). Après un entraînement en endurance, la réduction de la pression artérielle systolique et diastolique mesurée au repos, chez des sujets hypertendus, disparaît lorsque la production de NO et de prostacyclines est inhibée pharmacologiquement (Nyberg et al. 2012). L'entraînement en endurance réduit aussi la pression artérielle et veineuse centrale, chez des sujets jeunes et sains (Mortensen et al. 2013). Cette réduction post-entraînement de la pression artérielle sanguine permet de diminuer la post-charge cardiaque, participant ainsi à l'augmentation du volume d'éjection systolique au cours de l'exercice (Mortensen et al. 2013).

1.3.3 *Adaptations vasculaires à l'entraînement*

La fonction des artères de conduction et de résistance est de permettre le transport du sang au sein du muscle, déterminant ainsi l'apport en O_2. Le diamètre et les propriétés élastiques des artères doivent être adéquats, de sorte que le débit sanguin provenant du cœur ne puisse pas être limité. De ce fait, les résistances vasculaires émergent principalement des artères de résistance, dont les artérioles (se situant au sein des tissus tels que le muscle), en déterminent la plus grande proportion (Hellsten et Nyberg 2015). Chez l'homme, la capacité de perfusion de la totalité de la masse musculaire dépasse la capacité de pompage du cœur (Saltin 1988). Le débit sanguin musculaire est de haut niveau, de l'ordre de 200 à 300 $mL.min^{-1}.100g^{-1}$, lorsqu'une faible masse musculaire est engagée, contre 150 $mL.min^{-1}.100g^{-1}$ lors d'exercices mobilisant une forte proportion de la masse musculaire (Saltin 1988). Toutefois, des adaptations vasculaires à l'entraînement en endurance surviennent parallèlement à l'augmentation du débit

cardiaque maximal. Par exemple, les dimensions du ventricule gauche et de l'artère fémorale commune sont corrélées, que ce soit chez les sujets sédentaires ou chez les athlètes entraînés en endurance (Schmidt-Trucksäss et al. 2003).

1.3.4 Adaptations structurales

Au niveau des artères de conduction, il a été observé une corrélation étroite (r= 0,91) entre le $\dot{V}O_{2max}$ mesuré sur ergocycle, et le diamètre de l'artère fémorale commune chez des sujets jeunes et sains (Rådegran et Saltin 2000). Cette association suggère que les artères de conduction peuvent imposer des limitations à l'apport en O_2, particulièrement lors d'exercices impliquant une masse musculaire importante (Rådegran et Saltin 2000). Des adaptations structurales sont constatées suite à l'entraînement et contribuent à l'augmentation de $\dot{V}O_{2max}$. Chez des sujets jeunes et sains, un programme d'entraînement en endurance de 6 mois, à raison de 3 séances/semaine, augmentait le $\dot{V}O_{2max}$ de 3,6 ± 0,7 à 3,8 ± 0,6 $L.min^{-1}$. Parallèlement le diamètre de l'artère fémorale était augmenté de 6,2 ± 0,7 à 6,4 ± 0,6 mm (Spence et al. 2013). Les effets de l'entraînement ont été confirmés par des études transversales. Le diamètre de l'artère brachiale d'athlètes spécialisés dans des disciplines sollicitant le haut du corps, tels que les canoéistes, est plus large comparativement à celui d'athlètes non spécialistes (Rowley et al. 2012). De façon similaire, les coureurs et les cyclistes présentent une artère fémorale superficielle dont le diamètre est plus important que celui de sujets actifs mais non spécialistes de ces disciplines (Rowley et al. 2012). Ainsi, la taille des artères de conduction est régulée localement à la suite de l'entraînement, en vue de répondre à la demande métabolique des muscles actifs de chaque extrémité impliquée dans l'exercice. De plus, cette association entre la spécificité de l'activité physique pratiquée et les adaptations structurales est confirmée lors de comparaisons intra-individuelles. Ainsi, les joueurs de tennis professionnels ont une artère sous-clavière plus large dans leur bras dominant notamment mobilisé au cours de la pratique, comparativement au bras non-dominant (Huonker et al. 2003). Ces résultats confortent l'effet de l'entraînement sur le remodelage des artères de conduction.

Au niveau des artères de résistance, la dimension des vaisseaux est estimée à travers la réponse vasodilatatrice maximale après une période d'ischémie prolongée ou d'un exercice associé à une ischémie (Naylor et al. 2005). Cette réponse est censée refléter la capacité structurale au niveau microvasculaire (Naylor et al. 2005). Après un entraînement de 4 semaines

de type « handgrip », la réponse vasodilatatrice maximale est augmentée de 30 % au niveau de l'avant-bras chez des sujets sains, alors qu'aucun changement n'est observé dans le bras non entraîné (Sinoway et al. 1987). En outre, la réponse vasodilatatrice maximale est plus importante chez des sujets entraînés en endurance que chez des sujets sédentaires (Snell et al. 1987). À l'instar des vaisseaux de conduction, le réseau microvasculaire semble également lié à la demande métabolique des muscles actifs lors de l'exercice. De fait, il a été rapporté chez des joueurs de tennis que la réponse vasodilatatrice maximale est 42 % plus élevée dans le bras dominant, par comparaison au bras non-dominant (Sinoway et al. 1986).

Les mécanismes régulant le remodelage artériel dépendent du débit sanguin circulant dans les vaisseaux. Il a été observé, par exemple, que chez le lapin, le diamètre de l'artère carotidienne commune était diminué de 21 % lorsque le débit sanguin de cette artère était diminué de 70 % pendant 2 semaines (Langille et O'Donnell 1986). En revanche, cet effet disparaissait lorsque l'endothélium était au préalablement retiré (Langille et O'Donnell 1986). Différentes études ont indiqué l'importance des contraintes de cisaillement dans le remodelage artériel. Ces contraintes de cisaillement correspondent aux forces de friction exercées sur l'endothélium par le sang lors de sa circulation au sein des vaisseaux sanguins (Hellsten et Nyberg 2015). Ces contraintes de cisaillement liées à l'augmentation du flux sanguin constituent le stimulus le plus puissant pour l'artériogenèse dans les vaisseaux exposés (Pipp et al. 2004). Chez l'animal, le degré des contraintes de cisaillement module les changements de diamètre de l'artère mésentérique ainsi que l'expression génique de l'eNOS (Tuttle et al. 2001). Après la réalisation d'une fistule artério-veineuse afin d'augmenter le débit sanguin de façon chronique, des lapins ont été séparés en deux groupes : le premier groupe était traité pendant 4 semaines avec un inhibiteur pharmacologique des NOS, et le second groupe servait de contrôle (Tronc et al. 1996). L'augmentation du diamètre de l'artère carotidienne gauche dans le groupe avec inhibition des NOS était réduite comparativement à celle observée dans le groupe contrôle (Tronc et al. 1996). Cette observation met ainsi en évidence le rôle du NO dans le remodelage artériel induit par le débit sanguin. L'effet de l'entraînement sur la structure vasculaire résulte de la libération de NO par l'endothélium en réponse aux forces de cisaillement sur les parois vasculaires, ce qui permet finalement de réduire les contraintes imposées lors d'exercices répétés (Green et al. 2004a). Dans un modèle de rat simulant une artériopathie oblitérante des membres inférieurs, un entraînement en endurance de 3 semaines augmentait la réponse vasodilatatrice maximale au niveau des muscles de la jambe (Lloyd et al. 2001). En revanche, cette réponse était atténuée chez les rats traités avec un inhibiteur pharmacologique des NOS

(Lloyd et al. 2001). Chez l'homme, des sujets sains ont pris part à un entraînement de type « handgrip » de 8 semaines durant lequel, une occlusion partielle au niveau de l'un des bras était réalisée, afin de réduire les contraintes de cisaillement dans l'artère brachiale lors de l'exercice (Tinken et al. 2010). La réponse vasodilatatrice maximale augmentait progressivement durant la période d'entraînement dans le bras sans occlusion, a contrario aucun changement n'était observé dans le bras avec occlusion (Tinken et al. 2010).

En conclusion, le remodelage des artères de conduction et de résistance est localisé dans les membres où la demande métabolique est la plus grande. Cette particularité semble corroborer l'association entre le $\dot{V}O_{2max}$ *au cours d'un exercice de cycle et l'artère fémorale chez des sujets jeunes. L'augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins apparaît donc comme un élément de la cascade physiologique conduisant à l'apport en* O_2 *aux muscles actifs. D'un point de vue fonctionnel, le remodelage artériel permettrait de réduire les résistances lorsque le niveau de perfusion musculaire augmente (Hellsten* et *Nyberg 2015), et de révéler une réserve vasodilatatrice renforcée chez les sujets entraînés (Green et al. 2012). Les contraintes de cisaillement sur l'endothélium induite par l'augmentation du débit sanguin semblent être responsable de l'adaptation structurale vasculaire. Le NO synthétisé au niveau de l'endothélium en réponse à ces contraintes, déclenche par la même occasion le processus de remodelage artériel.*

1.3.5 Adaptations fonctionnelles

Concernant les artères de conduction, la fonction vasculaire est généralement évaluée à travers la dilatation dépendante du débit sanguin (FMD) au niveau des artères brachiale et fémorale, à la suite de période d'ischémie réalisée avec un brassard occlusif placé dans la zone distale du membre investigué (Thijssen et al. 2011a). La FMD est considérée comme un indicateur de la fonction endothéliale, dont la réponse est principalement dépendante de la biodisponibilité du NO (Thijssen et al. 2011a). Une méta-analyse basée sur 5 547 participants indique que chaque diminution de 1 % ou d'un écart-type de la valeur de FMD est associée à une augmentation du risque d'événements cardiovasculaires, de 8 % à 22 % respectivement (Inaba et al. 2010). En outre, la FMD au niveau de l'artère brachiale est corrélée avec le $\dot{V}O_{2max}$ chez des sujets sains et indépendamment de l'âge des individus (Rinder et al. 2000; Palmieri et al. 2005). Ces associations indiquent qu'une vasodilatation dépendante du NO accrue pourrait

contribuer à un niveau élevé de $\dot{V}O_{2max}$, en participant à l'augmentation de l'apport en O_2, afin de répondre à la demande métabolique des muscles actifs. La FMD au niveau de l'artère brachiale apparait supérieure chez les athlètes que chez les sujets du groupe contrôle (Montero et al. 2014). Toutefois, après une analyse de sous-groupes basée sur l'âge, cette différence persistait uniquement chez des athlètes âgés de plus de 50 ans, lorsque ces derniers étaient comparés aux individus contrôles, appariés sur l'âge (Montero et al. 2014). Chez les sujets plus jeunes, il se pourrait que l'entraînement n'améliore la fonction vasculaire que dans le contexte d'une fonction endothéliale altérée ; le cas échéant, un programme d'entraînement ne pourrait de plus avoir d'effet chez les sujets jeunes et sains que si l'intensité et le volume sont élevés (Green et al. 2004a).

Dans le cadre de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, la composante vasculaire du système cardiovasculaire fait partie des déterminants majeurs du $\dot{V}O_{2max}$, et peut expliquer jusqu'à 50 % de sa variance (Kraemer et al. 1993). Une FMD réduite au niveau de l'artère radiale est observée uniquement chez des patients ayant une insuffisance cardiaque, par rapport aux sujets sains, et cette altération était accentuée lorsqu'un inhibiteur pharmacologique des NOS était infusé (Hornig et al. 1996). Après 4 semaines d'entraînement de type « handgrip », la FMD est améliorée dans le groupe de patients, et la proportion de FMD dépendante du NO était restaurée au même niveau que celle observée chez les sujets sains (Hornig et al. 1996). Ces adaptations ont été confirmées dans d'autres pathologies. Des patients diabétiques de type 2 ont présenté une FMD au niveau de l'artère brachiale supérieure, à la suite d'un programme d'entraînement de 8 semaines (Maiorana et al. 2001a). L'ensemble de ces résultats semblent confirmer qu'une fonction endothéliale altérée est favorablement affectée à la suite d'une période d'entraînement.

Toutefois, une FMD accrue a été observée chez des cyclistes et des nageurs de niveaux national et international, au niveau de l'artère axillaire et de l'artère fémorale superficielle, par rapport à des sujets sédentaires (Walther et al. 2008). Chez des sujets jeunes et sains non entraînés au préalable, un programme d'entraînement en endurance de 6 mois augmentait le $\dot{V}O_{2max}$ et le rapport FMD sur dilatation dépendante de la nitroglycérine (GTN), au niveau de l'artère fémorale (Spence et al. 2013). Ce rapport reflète la vasodilatation dépendante de l'endothélium, en isolant la capacité vasodilatatrice liée aux cellules musculaires lisses (Spence et al. 2013). La GTN est utilisée pour déterminer la dilatation indépendante de l'endothélium, puisque celle-ci est biotransformée en NO, pouvant ainsi induire directement le phénomène de

vasodilatation (Hashimoto et Kobayashi 2003). Ces résultats montrent que l'amélioration de la fonction vasculaire au niveau des artères de conduction est éventuellement possible à l'issue de l'entraînement, même chez des sujets sans pathologie chronique.

Concernant les artères de résistance, la fonction vasculaire est estimée, à travers la perfusion intra-artérielle d'agonistes du NO tels que l'acétylcholine (ACh), avec l'utilisation conjointe d'un pléthysmographe, afin de mesurer la réponse du débit sanguin au niveau du membre étudié (Green et al. 2004a). Les résultats sont équivoques sur les améliorations de la fonction vasculaire au niveau microvasculaire en réponse à l'entraînement. Un programme d'entraînement de 8 semaines composé d'exercices de type aérobie majoritairement, augmentait le $\dot{V}O_{2max}$ de 28,6 à 32,6 $mL.kg^{-1}.min^{-1}$ chez des sujets d'âge moyen (Maiorana et al. 2001b). Cette élévation du $\dot{V}O_{2max}$ n'était pas accompagnée d'une amélioration de la réponse à l'ACh au niveau de l'avant-bras (Maiorana et al. 2001b). Ce même programme d'entraînement s'est avéré améliorer la fonction endothéliale au niveau microvasculaire chez des sujets diabétiques de type 2, à la dose d'ACh la plus élevée (Maiorana et al. 2001a), ainsi que chez des patients avec une insuffisance cardiaque, pour l'ensemble des doses d'ACh testées (Maiorana et al. 2000). A l'instar des artères de conduction, une fonction vasculaire altérée semble plus susceptible d'être améliorée par l'entraînement. Dans le cas des pathologies vasculaires périphériques, l'amélioration de la fonction endothéliale des artères de résistance peut contribuer à une élévation du $\dot{V}O_{2max}$, et ainsi augmenter la capacité fonctionnelle. À la suite d'un programme d'entraînement de 6 mois d'intensité modérée, des patients ayant une insuffisance cardiaque présentaient une augmentation de la réponse à l'ACh de 203 % au niveau de l'artère fémorale, et une réduction du débit sanguin accentuée, lors de la perfusion d'un inhibiteur pharmacologique des NOS (Hambrecht et al. 1998). Le $\dot{V}O_{2max}$ était augmenté de 26 % dans le groupe de patients entraînés (Hambrecht et al. 1998). L'amélioration du $\dot{V}O_{2max}$ était significativement corrélée avec les changements du débit sanguin dépendant du NO (Hambrecht et al. 1998). En plus d'une augmentation de la biodisponibilité en NO et de l'apport en O_2 aux muscles actifs, l'amélioration de la fonction vasculaire périphérique peut contribuer à renforcer la fonction cardiaque, notamment dans le cadre de pathologies cardiovasculaires. Chez des patients ayant une insuffisance cardiaque, la réduction des résistances périphériques liée à une amélioration de la fonction endothéliale était corrélée à l'augmentation du volume d'éjection systolique (Hambrecht et al. 2000). Toutefois, ces adaptations fonctionnelles ne semblent pas uniquement limitées à une fonction vasculaire altérée. Dans une méta-analyse, la dilatation dépendante de l'endothélium au niveau microvasculaire est supérieure chez les

athlètes, comparativement aux sujets contrôles appariés sur l'âge (Montero et al. 2015). Cette différence reste significative lorsque la population est analysée séparément avec comme critère de dissociation, l'âge des participants : jeunes < 40 ans et âgés > 55 ans (Montero et al. 2015).

Comme pour les adaptations structurales, les mécanismes responsables des adaptations fonctionnelles sont dépendants des contraintes de cisaillement du débit sanguin sur l'endothélium, entraînant une stimulation de la production du NO. Chez l'animal, un entraînement de 3 semaines sur un tapis de course augmentait la dilatation dépendante du débit sanguin dans le groupe de rats entraînés (Koller et al. 1995). Cet effet disparaît après l'élimination de l'endothélium, et diminuait de 50 % après l'inhibition de la synthèse du NO (Koller et al. 1995). Dans une autre étude, la réponse vasodilatatrice en réponse à l'ACh était supérieure chez les rats, prenant part à un entraînement de 12 semaines sur tapis de course, comparativement aux rats sédentaires, sans renforcement de la sensibilité des cellules musculaires lisses (Delp et al. 1993). Cette réponse à l'ACh était inhibée de 79 % après l'inhibition de la synthèse du NO dans le groupe de rats sédentaires, contre 100 % dans le groupe de rats entraînés (Delp et al. 1993). Ces résultats chez l'animal renforcent le rôle du NO dans les adaptations vasculaires en réponse à l'exercice. Chez l'Homme, un entraînement de 4 semaines de type aérobie élevait la réponse à l'ACh de 56 % chez des patients présentant une coronaropathie stable (Hambrecht et al. 2003). Les patients ayant suivi le programme d'entraînement avaient une expression de l'eNOS deux fois plus importante au niveau de l'artère mammaire, et un niveau de phosphorylation de l'eNOS quatre fois plus élevé, par rapport aux patients sédentaires (Hambrecht et al. 2003). De plus, le niveau de phosphorylation de l'eNOS était positivement corrélé aux changements de la réponse vasodilatatrice. Cette étude confirme l'implication du NO dans l'amélioration de la fonction vasculaire indépendamment de l'espèce impliquée, et apporte l'existence d'un lien entre l'élévation de la vasodilatation et la biodisponibilité du NO.

En conclusion, les adaptations fonctionnelles vasculaires induites par l'entraînement augmentent l'apport en O_2 au sein des muscles squelettiques. La fonction vasculaire dépendante du NO semble être liée à l'aptitude aérobie et à l'entraînement en endurance aussi bien au niveau des artères de résistance que de conduction (Rywik et al. 1999; DeSouza et al. 2000; Green et al. 2004c). Le NO apparaît donc comme un acteur majeur dans la fonction et la structure vasculaires, dont la biodisponibilité pourrait déterminer la perfusion musculaire à l'exercice et le $\dot{V}O_{2max}$. Cependant, il reste certains points qui prêtent à controverse sur la

possibilité d'améliorations au niveau vasculaire chez les sujets jeunes et sains lorsque la fonction endothéliale est intacte. Les adaptations vasculaires ont été présentées comme un élément dynamique oscillant entre modifications fonctionnelles et structurales afin de répondre continuellement aux stimuli générés au cours de l'exercice (Spence et al. 2013; Green 2013; Montero et al. 2013). Il est donc essentiel de caractériser les facteurs pouvant influencer la biodisponibilité du NO dans la perspective de dénouer les causes de l'association entre l'aptitude aérobie et la prédiction des risques cardiovasculaires ainsi que de la mortalité.

2. Régulation de la perfusion musculaire

Au cours de l'exercice d'intensité maximale, le débit sanguin au niveau des fibres musculaires augmente jusqu'à 80 fois au-dessus de celui observé en condition de repos dans les fibres de type lent (Sarelius et Pohl 2010). Cette augmentation de la perfusion musculaire lors de l'exercice d'intensité maximale est concomitante d'une élévation du $\dot{V}O_2$ musculaire de 20 à 50 fois le $\dot{V}O_2$ de repos (Sarelius et Pohl 2010). Ainsi, la demande en O_2 au niveau des muscles actifs lors de l'exercice d'intensité maximale est étroitement associée à la réponse du débit sanguin perfusant les muscles. Cependant, cette relation peut être altérée en cas de pathologies. Chez des sujets diabétiques de type 2, l'altération du débit sanguin au niveau de l'artère fémorale, mesuré au cours d'un exercice d'extension de la jambe est accompagnée d'une réduction de 20 % du $\dot{V}O_{2max}$ atteint durant un test d'effort maximal sur ergocycle par rapport à des sujets sains contrôles (Lalande et al. 2008). Il est donc primordial de déterminer les facteurs impliqués dans la régulation de la perfusion musculaire à l'exercice.

L'élévation du débit sanguin en réponse à l'exercice est obtenue simultanément par une augmentation du débit cardiaque et une réduction des résistances vasculaires périphériques dans les muscles actifs (Whyte et Laughlin 2010; Hellsten et Nyberg 2015). Le débit cardiaque augmente dès le début de l'exercice par une activation du système nerveux sympathique, qui induit par ailleurs une vasoconstriction dans l'ensemble des organes (Hellsten et Nyberg 2015). Au niveau des muscles actifs, cette stimulation sympathique est contrebalancée par la production d'agents vasodilatateurs et sympatholytiques (Whyte et Laughlin 2010). Les résistances vasculaires périphériques sont déterminées par le diamètre des artères de résistance, lequel est contrôlé par le niveau de contraction des muscles lisses vasculaires entourant ces artères (Whyte et Laughlin 2010). La contraction des muscles lisses vasculaires est sous l'influence, d'une part du niveau basal de contraction de ces muscles, et d'autre part de l'activité sympathique, et enfin de facteurs chimiques et mécaniques au sein des tissus musculaires (Whyte et Laughlin 2010). Cette interaction complexe entre les stimuli vasodilatateurs et vasoconstricteurs permet de maintenir la pression artérielle moyenne stable, au cours de l'exercice, tout en préservant l'apport en O_2 nécessaire aux muscles actifs (Joyner et Casey 2015). L'activité sympathique limite le débit sanguin au sein des muscles actifs afin d'empêcher que la capacité vasodilatatrice ne dépasse la capacité de pompage cardiaque (Raven 2008). Chez des sujets âgés (> 65 ans) dont le débit cardiaque maximal est réduit avec le vieillissement, le

débit sanguin au niveau de l'avant-bras, lors d'un exercice de type « handgrip », est préservé au niveau de celui mesuré chez les sujets sains et jeunes (< 30 ans) (Donato et al. 2006). A contrario, dans les mêmes populations, le débit sanguin au niveau de l'artère fémorale commune est réduit chez les sujets âgés lorsque l'exercice mobilise une masse musculaire importante (Donato et al. 2006). Ces résultats supposent qu'une activité sympathique accrue est nécessaire afin de contrôler la pression artérielle chez les sujets ayant un débit cardiaque maximal altéré (Poole et al. 2012). Par ailleurs, les agents vasodilatateurs s'opposant à la vasoconstriction sympathique ont différentes origines, et sont sécrétés localement afin de répondre adéquatement à la demande métabolique (Hellsten et Nyberg 2015). Au niveau vasculaire, l'endothélium est la source majeure d'agents vasodilatateurs. Il sécrète notamment le NO, les prostaglandines, et des facteurs hyperpolarisants, en réponse aux forces de cisaillements exercées sur les parois vasculaires, et en réponse à des agents chimiques tels que l'adénosine triphosphate (ATP) et l'adénosine (Clifford et Hellsten 2004; Murrant et Sarelius 2015). Les cellules musculaires squelettiques, lors de leur contraction, produisent également des agents vasodilatateurs comme le NO, l'ATP et l'adénosine, lesquels peuvent agir directement ou indirectement sur le niveau de contraction des muscles lisses vasculaires se trouvant à proximité (Clifford et Hellsten 2004). Les érythrocytes, circulant dans le lit vasculaire des muscles actifs, peuvent contribuer à la vasodilatation en libérant du NO et de l'ATP, à la suite d'une diminution de la pression partielle en oxygène, d'une part du pH, et d'autre part de contraintes de déformation au cours de la contraction musculaire (Singel et Stamler 2005; Ellsworth et Sprague 2012).

Plusieurs mécanismes peuvent participer à la vasodilatation des artères alimentant les muscles actifs afin d'assurer l'apport en O_2, selon la demande métabolique.

La réponse myogénique correspond à la réponse des muscles lisses vasculaires au changement de la pression transmurale au sein du lit vasculaire, laquelle survient lors des variations de pressions artérielles lors de l'exercice (Hellsten et Nyberg 2015). La pression pulsée, représentant la différence entre les pressions artérielles durant la systole et la diastole, est augmentée au cours de l'exercice, en raison de la vasodilatation périphérique en diastole et de l'élévation du volume d'éjection systolique (Joyner et Casey 2015). La réponse myogénique comporte trois phases en réponse au changement de pressions au sein de la lumière des vaisseaux sanguins (Carlson et al. 2008). Les artérioles se dilatent passivement, lors de l'augmentation de la pression, induisant subséquemment une constriction myogénique afin de maintenir la pression artérielle. Au-delà de 140 mmHg, toute élévation supplémentaire de la pression conduit à une dilatation dépendante de la réponse myogénique. Cette réponse

myogénique pourrait être également responsable de la vasodilatation induite par la compression mécanique résultant de la contraction musculaire. En effet, des artères isolées de rats, provenant du soleus, se dilatent à la suite de la répétition de compression mécanique ; cette réponse étant à la fois dépendante d'une composante endothéliale et non endothéliale (Clifford et al. 2006).

Les contraintes de force générées au cours de l'exercice induisent une vasodilatation dépendante de l'endothélium, laquelle est principalement sous l'influence du NO (Koller et Bagi 2002; Murrant et Sarelius 2015). Une méta-analyse a montré que la dilatation dépendante du flux sanguin, au niveau des artères de conduction, est majoritairement déterminée par la biodisponibilité du NO (Green et al. 2014). La perfusion d'un inhibiteur de la NO synthase, la N-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), réduit la dilatation dépendante du flux sanguin de 6,5 % à 0,9 % comparativement à la solution saline (Green et al. 2014). Les stimuli mécaniques, responsables de la production du NO par l'endothélium, sont notamment les contraintes de cisaillement et la compression périodique exercées sur les parois des vaisseaux sanguins (Lamontagne et al. 1992). Ce mécanisme impliqué dans la vasodilatation, lors de l'exercice, survient particulièrement dans les artérioles les plus larges, alors que la sensibilité aux contraintes de cisaillement est moindre dans les artérioles les plus petites (Pohl et al. 2000). Les artères de conduction et de résistance sont ainsi sous l'influence de différents mécanismes au cours de l'hyperémie à l'exercice. Il existerait une différence entre les cinétiques de débit sanguin, au niveau de l'artère fémorale et des capillaires chez des sujets sains, au cours d'un exercice d'extension de la jambe à intensité modérée (Harper et al. 2006). De ce fait, il semble que la dilatation dépendante du flux sanguin permettrait la coordination de la réponse vasculaire à l'exercice (Clifford et Hellsten 2004; Murrant et Sarelius 2015). Au cours de cette réponse, les artérioles terminales se dilatent en raison de la présence de métabolites émanant du muscle squelettique. La dilatation de ces artérioles augmente le gradient de pression intravasculaire, pouvant ainsi conduire à une augmentation du débit sanguin dans les artères de conduction situées en amont.

Un autre mécanisme est en mesure de coordonner la dilatation des artères de résistance à celle des artères de conduction. La vasodilatation conduite est un processus permettant d'étendre le phénomène de vasodilatation aux vaisseaux sanguins en amont, lesquels ne sont pas exposés aux signaux vasodilatateurs chimiques et mécaniques survenant au sein du muscle squelettique, lors de la contraction (Bagher et Segal 2011). Ce processus de transmission est dépendant de la présence de l'endothélium, et de la communication intercellulaire entre les cellules musculaires lisses vasculaires et endothéliales, à travers notamment la propagation de signaux électriques (Joyner et Casey 2015). Toutefois, chez le hamster, au cours de stimulations

des fibres musculaires, l'inhibition de la NO synthase atténue la dilatation de la branche artériolaire alimentant le réseau capillaire étudié, sans altération de la dilatation de l'artériole proximale (Cohen et al. 2000). Ces résultats impliquent qu'une partie de la transmission du signal, lors de la vasodilatation conduite, est également dépendante de la biodisponibilité du NO. Ainsi, ce mécanisme permet aux capillaires, lors de la contraction musculaire, de réguler leur propre perfusion, en initiant une dilatation à travers plusieurs générations d'artérioles supérieures, et limitant ainsi le débit sanguin au niveau des fibres musculaires actives (Murrant et Sarelius 2000). La coordination de la vasodilatation, à travers le lit vasculaire, permet une diminution des résistances vasculaires, afin de distribuer un débit sanguin élevé vers les capillaires se situant au sein des muscles actifs au cours de l'exercice (De Wit 2004). Ceci conduit à la création d'une circulation d'érythrocytes dans la lumière de capillaires, exposés initialement à un faible débit plasmatique en condition de repos (Golub et Pittman 2013). Lors de l'exercice, l'augmentation de la concentration d'érythrocytes dans les tissus permet d'accroître l'apport en O_2 afin de répondre à la demande métabolique (Sarelius et Pohl 2010).

En lien avec la vasoconstriction sympathique survenant au cours de l'exercice, la compression inhérente à la contraction musculaire participe au retour veineux vers le cœur, contribuant ainsi à maintenir l'augmentation du débit cardiaque (Osada et al. 1999; Sheriff 2010). En raison de la vasodilatation du lit vasculaire au sein du muscle, une proportion accrue du débit cardiaque est dirigée vers ces tissus, permettant ainsi le maintien de la pré-charge cardiaque (Sheriff 2010). La compression musculaire au cours de la contraction expulse le sang du compartiment veineux, ce qui entraîne une réduction de la pression veineuse (Laughlin 1987). Celle-ci permet d'étendre le gradient des pressions de perfusion entre le compartiment artériel et veineux, pouvant ainsi renforcer le débit sanguin distribué aux muscles actifs (Laughlin 1987). De plus, lors de la phase de relaxation, le muscle réalise un effet de « succion » au niveau des vaisseaux sanguins (plus particulièrement au niveau des veines) en maintenant leur diamètre d'ouverture (Joyner et Casey 2015). Ce phénomène contribue également à augmenter le débit sanguin à travers une élévation de la pression de perfusion. Ainsi, l'effet de pompage du muscle squelettique, dès le début de l'exercice, serait responsable de l'élévation immédiate du débit sanguin (0-5s), tandis que la vasodilatation, se produisant 15-20s après l'initiation de la contraction musculaire, serait davantage dépendante de signaux chimiques (Tschakovsky et Sheriff 2004; Joyner et Casey 2015).

La majorité des mécanismes responsables de la vasodilatation à l'exercice émane de la lumière des vaisseaux sanguins, lesquels se trouvent au sein ou en amont des muscles squelettiques perfusés. Les métabolites présents dans l'interstitium, qui peuvent être libérés par

le muscle actif, lors de la contraction musculaire, sont également impliqués dans la régulation du débit sanguin à l'exercice (Sarelius et Pohl 2010). Les métabolites s'accumulant dans l'interstitium à l'exercice sont notamment le NO, l'ATP, l'adénosine et les prostacyclines (Hellsten et Nyberg 2015). Ces composants métaboliques peuvent induire une vasodilatation, à travers une action directe sur les cellules musculaires lisses ou une interaction avec les cellules endothéliales, initiant alors une vasodilatation conduite au niveau vasculaire, et une sécrétion d'agents vasodilatateurs au niveau artériolaire (Sarelius et Pohl 2010). Toutefois, le NO semble être un médiateur « central », qui est impliqué dans la réponse des métabolites libérés par le muscle squelettique dans l'interstitium. Chez des sujets jeunes et sains, la réponse vasodilatatrice à l'adénosine au niveau de l'avant-bras est inhibée à la suite de la perfusion d'un inhibiteur de la NO synthase (Martin et al. 2006). Concernant la vasodilatation dépendante de l'ATP, la perfusion conjointe d'un inhibiteur de la NO synthase réduit le débit sanguin au niveau de la jambe, sans contribution de l'adénosine à l'action de l'ATP (Mortensen et al. 2009). L'implication suggérée du NO dans la vasodilatation dépendante de l'ATP semble être confirmée par la localisation de récepteurs purinergiques au niveau de l'endothélium, lesquels sont activés par l'ATP et peuvent induire une vasodilatation périphérique (Mortensen et al. 2009). Par ailleurs, la réponse vasodilatatrice dépendante des prostacyclines est abolie chez des sujets jeunes, lorsqu'un inhibiteur de la NO synthase est administré, mais cet effet n'est pas observé chez des sujets âgés (Nicholson et al. 2009). Alors que le vieillissement est associé à une altération de la fonction endothéliale (Seals et al. 2006), la vasodilatation dépendante des prostaglandines, libérées par l'endothélium, est également dépendante de la biodisponibilité du NO.

3. Régulation de la biodisponibilité du NO

3.1 Synthèse du NO

3.1.1 Voie enzymatique à travers les NO synthases

Le NO est produit par les enzymes, NO synthase dont il existe trois isoformes : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS), et la NOS inductible (iNOS) (Brown 2001). Les NOS utilisent comme substrat de la L-arginine, de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH), de l'oxygène. Elles produisent du NO, de la citrulline et de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée (NADP) (Förstermann et Sessa 2012). La nNOS est largement exprimée dans les muscles squelettiques chez les mammifères (Förstermann et Sessa 2012). Chez l'homme, l'activité et l'expression de la nNOS sont plus élevées dans les muscles squelettiques comparativement à celles relevées au niveau du cerveau (Nakane et al. 1993). La eNOS est principalement exprimée dans les cellules endothéliales (Förstermann et Sessa 2012). Chez le rat, la eNOS est aussi exprimée au niveau des muscles squelettiques, sans différence d'expression entre les fibres musculaires à composante lente, soleus, et à composante rapide, EDL (Kapur et al. 1997). La nNOS et la eNOS, deux isoformes, sont activées de façon transitoire afin de réguler les fonctions physiologiques, a contrario la iNOS est activée continuellement au cours de la réponse immunitaire en vue de l'élimination des pathogènes (Brown et al., 2001).

Toutes les isoformes de la NOS sont des homodimères (Förstermann et Sessa 2012). La formation de l'homodimère nécessite la fixation de calmoduline et de BH_4 afin de stabiliser le complexe protéique (Kone et al., 2003). Le couplage du domaine réductase d'un monomère de la NOS avec le domaine oxygénase d'un autre monomère partenaire est nécessaire afin de produire du NO (Levine et al., 2012). Chaque monomère de la NOS contient d'une part, un domaine oxygénase constitué d'un site de fixation pour la tétrahydrobioptérine (BH_4) et d'autre part, un site actif ayant une activité enzymatique similaire aux cytochromes P-450. Il dispose également d'un domaine réductase composé d'un système de transfert d'électrons, lequel fixe la flavine mononucléotide (FMN), ainsi que la flavine adénine dinucléotide (FAD) (Kone, et al. 2003). Quand la NOS est formée de façon fonctionnelle, les électrons issus de la NADPH sont transférés au domaine oxygénase contenant l'hème du cytochrome P-450, par le biais, au préalable, du complexe FAD et FMN se situant sur le domaine réductase (Förstermann et Sessa

2012). Ce transfert d'électrons permet à la NOS d'effectuer une double oxydation afin de former de la L-citrulline et du NO à partir de la L-arginine (Förstermann et Sessa 2012). Les mécanismes catalytiques amenant à la formation du NO via la voie enzymatique des NO synthases sont présentés dans la Figure 2.

La eNOS et la nNOS sont activées par l'interaction entre le calcium et la calmoduline, mais aussi par la phosphorylation à travers différentes protéines kinases (Förstermann et Sessa 2012). La fixation de la calmoduline est déclenchée par une élévation transitoire du niveau intracellulaire de calcium (Ca^{2+}), qui facilite le transfert d'électrons du domaine réductase d'un des monomères au domaine oxygénase de l'autre monomère partenaire (Kone et al., 2003). En condition de repos, la eNOS et la nNOS sont fixées respectivement à la cavéoline-1 et -3, les rendant ainsi inactives. Lorsqu'un agoniste comme la bradykinine, responsable de l'élévation intracellulaire de la concentration du Ca^{2+}, est libéré au cours de l'exercice (Langberg et al. 2002), la cavéoline se détache de la NOS, facilitant ainsi à la fixation de la calmoduline (Kone et al., 2003). La stimulation de la production du NO via ce mécanisme a été confirmée par la diminution de la dilatation dépendante de la bradykinine lors de la perfusion d'un inhibiteur de la NOS (Kuga et al. 1997). D'autres mécanismes sont responsables de l'activation des NOS à l'exercice. Les contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin sur les parois vasculaires activent la eNOS à travers la phosphorylation de la sérine^{1177} induite par la protéine kinase A et Akt (Förstermann et al., 2012). La phosphorylation de la sérine^{1177} a pour effet de stimuler le flux d'électrons dans le domaine réductase de la NOS, et d'augmenter la sensibilité de l'enzyme au Ca^{2+} (McCabe et al. 2000; Fleming et Busse 2003).

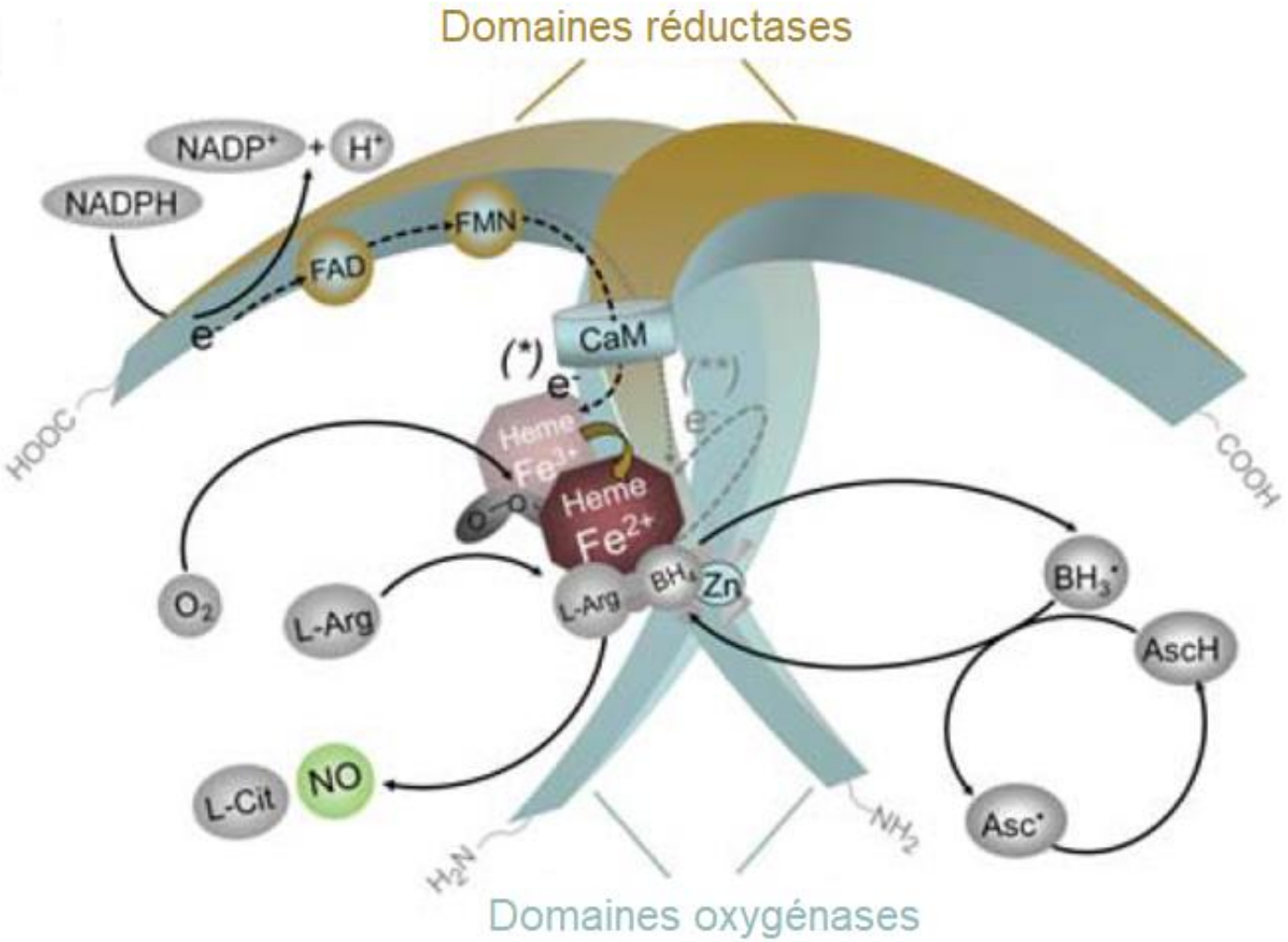


FIGURE 2. Structure et activité catalytique de la NO synthase (NOS)

La NO synthase est pleinement fonctionnelle en tant qu'homodimère. La présence de l'hème est indispensable à la dimérisation de la NOS et au transfert d'électrons des flavines à l'hème se trouvant sur le monomère opposé. Les activités catalytiques de la eNOS et de la nNOS sont sous l'influence de l'élévation de la concentration calcique (Ca^{2+}), laquelle permet à la calmoduline (CaM) de se fixer au complexe enzymatique. Lorsque le précurseur, la L-arginine et le co-facteur, la tétrahydrobioptérine (BH_4), sont en quantité suffisante, la NOS en état d'homodimère couple la réduction de l'hème et de l'O_2 à la synthèse du NO. La L-citrulline (L-Cit) est formée comme dérivé lors de la synthèse du NO. Le transfert d'électrons se fait du domaine réductase d'un des deux monomères au domaine oxygénase de l'autre monomère pair. La formation du NO est réalisée par la NOS à travers deux oxydations successives : l'une forme N^{ω}-hydroxy-L-arginine, et l'autre convertit cet intermédiaire en NO. À l'interface de la dimérisation, une conformation contenant l'ion zinc (Zn^{2+}) définit le site de fixation du BH_4 et de la L-arginine. Une fois fixés, les électrons issus du domaine réductase sont transférés au fer de l'hème (Fe^{3+}), permettant ainsi la fixation de l'O_2 et la formation d'espèces ferreuses (Fe^{2+}). Ces espèces ferreuses reçoivent un second électron issu du BH_4 ou du domaine réductase. Le BH_4 est oxydé en radical trihydrobioptérine (BH_3), lequel peut être recyclé par la NOS elle-même ou par la présence d'acide ascorbique. La figure ci-dessus est une version modifiée à partir de Förstermann et Sessa (2012).

3.1.2 Voie non enzymatique via la réduction du nitrite (NO_2^-)

Le nitrite (NO_2^-) et le nitrate (NO_3^-) ont longtemps été considérés comme des produits de l'oxydation du NO, sans aucune implication dans les processus physiologiques (Lundberg et al. 2008). On considère que les oxydes d'azote (NO_x), NO_2^- et NO_3^- réunis, servent de réservoir endogène de NO, par le biais de l'augmentation de leur concentration plasmatique. Néanmoins, une partie des NO_x est excrétée par les reins dans l'urine (Gladwin et al. 2005; Milsom et al. 2012). Dans le compartiment vasculaire, le NO est oxydé par l'oxyhémoglobine et l'oxymyoglobine à travers son interaction avec l'hème fixant l'O_2. Les produits de cette oxydation donnent successivement du NO_2^- et du NO_3^- (Lundberg et al. 2008). Au niveau plasmatique, le NO est ensuite rapidement oxydé en NO_2^- en réagissant avec des protéines contenant du cuivre comme la céruloplasmine, et avec l'oxygène (Lundberg et al. 2008; Jensen 2009). Au niveau cellulaire, le NO est réduit en NO_2^- à travers son auto-oxydation, mais cette réaction est lente et nécessite la présence de l'O_2 (Lundberg et al. 2008).

Par ailleurs, le réservoir endogène de NO peut être renforcé par l'ingestion d'aliments riches en NO_3^- (Lundberg et al. 2009). Certains végétaux tels que la laitue, les épinards, la betterave rouge contiennent trois fois plus de NO_3^- que la quantité quotidienne produite, de façon endogène, par l'ensemble des isoformes de la NOS (Lundberg et al. 2009). Récemment, chez les mammifères, une voie de synthèse du NO via la réduction successive du NO_3^- et du NO_2^- a été découverte (Gladwin et al. 2005). Les NO_3^- d'origine alimentaire, une fois ingérés, sont concentrés dans la salive par le biais des glandes salivaires, puis redirigés dans la cavité buccale (Gilchrist et al. 2010; Lundberg et Weitzberg 2010). Les concentrations salivaires de NO_3^- et de NO_2^- sont respectivement jusqu'à 20 et 3000 fois supérieures à celles mesurées au niveau plasmatique (Lundberg et Govoni 2004). Dans la cavité buccale, les NO_3^- salivaires sont réduits en NO_2^- par l'action de bactéries sur la langue, lesquelles utilisent le NO_3^- en tant que dernier accepteur d'électron lors de la respiration, en lieu et place de l'O_2 (Gilchrist et al. 2010). Cette première réduction du NO_3^- est indispensable, puisque des rats dont le statut sanitaire implique l'absence de bactéries, présentent une production gastrique de NO négligeable après l'ingestion de NO_3^- (Sobko et al. 2004). La salive est ensuite avalée, et rejoint le milieu acide de l'estomac (Lundberg et Weitzberg 2010). La présence d'un milieu acide et d'agents réducteurs tels que la vitamine C, les polyphénols, issus de l'alimentation, favorise la production gastrique de NO par dismutation (Lundberg et al. 2008; Lundberg et Weitzberg 2010). Le NO gastrique, une fois oxydé, rejoint le NO_3^- et NO_2^- non réduits, d'origine

alimentaire dans la circulation sanguine afin de contribuer au réservoir endogène vasculaire et tissulaire de NO (Jensen 2009; Milsom et al. 2012). La synthèse du NO, via la réduction du NO_2^-, au niveau vasculaire et tissulaire, fait intervenir différentes voies qui dépendent des conditions physico-chimiques du milieu telles que le pH, la concentration d'oxygène et le statut redox (Gladwin et al. 2005; Lundberg et al. 2008, 2009). La voie de réductions successives du NO_3^- et du NO_2^- impliquée dans la formation non enzymatique du NO est présentée dans la Figure 3.

Au niveau vasculaire, la formation du NO, à partir de la réduction du NO_2^-, s'effectue à travers la réaction avec l'hémoglobine (Gladwin et al. 2005; Lundberg et al. 2008). Cette dernière présente une activité réductase sous forme désoxygénée, et catalyse la réduction du NO_2^- en NO au niveau du centre fer de l'hème (Kim-Shapiro et al. 2006). La réduction du NO_2^-, par l'activité réductase de l'hémoglobine, est régulée de façon allostérique, et dépend de la pression en O_2 et du pH (Kim-Shapiro et al. 2006). L'allostérie correspond aux changements de configuration de l'hémoglobine, laquelle se présente sous deux états distincts : R et T (Gladwin et Kim-Shapiro 2008). Ce changement de configuration est également impliqué dans les capacités de transport et de libération de l'O_2 (Gladwin et Kim-Shapiro 2008). La transition entre les états R et T de l'hémoglobine sont sous l'influence d'effecteurs tels que la 2,3 diphosphoglycérate, le dioxyde de carbone (CO_2) et les protons (Gladwin et Kim-Shapiro 2008). Le taux de réduction du NO_2^- est déterminé par les propriétés allostériques avec une réaction 60 fois plus importante sous l'état R, par rapport à celle sous l'état T (Gladwin et Kim-Shapiro 2008). Le potentiel redox inférieur et l'affinité accrue sous l'état R sont responsables de l'accélération de la réduction du NO_2^- (Gladwin et Kim-Shapiro 2008). Toutefois, la présence d'hèmes désoxygénées est nécessaire pour la fixation du NO_2^- au niveau de l'hémoglobine (Gladwin et al. 2005). Ainsi, une saturation de l'hémoglobine en O_2 à hauteur de 50 % représente l'équilibre idéal entre l'état R et T, lequel contribue à un taux maximal de réduction du NO_2^- en NO (Lundberg et al. 2008). L'interaction de l'hémoglobine et du NO_2^- dans la production du NO et sa bioactivité ont été confirmées expérimentalement. La perfusion de NO_2^- induit une vasodilatation au niveau de l'avant-bras, laquelle est associée à la formation du NO au cours du transit dans l'artère brachiale (Cosby et al. 2003). Dans cette même étude, la formation du NO augmentait, lorsque la saturation de l'hémoglobine en oxygène diminuait (Cosby et al. 2003). Par ailleurs, d'autres voies de synthèse du NO, via la réduction du NO_2^-, existent au niveau vasculaire. La xanthine oxydoréductase est une enzyme responsable, sous conditions physiologiques normales, de l'oxydation de l'hypoxanthine puis de la xanthine en

acide urique, et de la réduction de l'oxygène en superoxyde et peroxyde d'hydrogène (Cantu-Medellin et Kelley 2013). Cette enzyme peut produire du NO sous certaines conditions : une diminution du pH et de la pression en O_2, une augmentation de la concentration de NADH (Cantu-Medellin et Kelley 2013). En outre, la eNOS semble être en mesure de produire du NO à travers la réduction du NO_2^- sous condition hypoxique, en utilisant le NO_2^- comme substrat en lieu et place de l'O_2 (Machha et Schechter 2011). Des auteurs ont rapporté une production significative de NO par la eNOS, via la réduction du NO_2^- sous anoxie (Vanin et al. 2007).

Au niveau tissulaire, la formation du NO, par le biais de la réduction du NO_2^-, s'effectue par l'interaction avec la myoglobine, et s'avère inhiber la respiration mitochondriale dans des tissus issus du cœur et du foie de rats (Shiva et al. 2007). Cette inhibition apparaît uniquement lorsque la myoglobine et le NO_2^- sont ajoutés conjointement aux tissus isolés (Shiva et al. 2007). Ce résultat confirme le rôle de la myoglobine dans la bioactivation du NO_2^-. La réduction du NO_2^- en NO par la myoglobine suit la même équation que celle de l'hémoglobine, et nécessite également la présence de protons et d'une faible saturation en O_2 (Kamga et al. 2012). La myoglobine possède une grande affinité à l'O_2 et un faible potentiel redox similaire à celui de l'état R de l'hémoglobine, et n'est pas régulée de façon allostérique (Gladwin et Kim-Shapiro 2008; Kamga et al. 2012). L'ensemble de ces propriétés confère à la désoxymyoglobine un taux de réduction du NO_2^- en NO 30 fois plus rapide par rapport à celui de la désoxyhémoglobine (Lundberg et al. 2008). En outre, la xanthine oxydoréductase est exprimée dans certains tissus humains, et semble contribuer aussi à la réduction du NO_2^- en NO au niveau tissulaire (Curtis et al. 2012). L'inhibition de la xanthine oxydoréductase altère les effets protecteurs du NO_2^- sur les dommages induits par l'ischémie/reperfusion au niveau du cœur, ceci est accompagné d'une diminution de la production du NO (Webb et al. 2004). En outre, la mitochondrie possède une activité réductase en mesure de réduire le NO_2^- en NO, à travers différents mécanismes (Shiva 2010). La réduction du NO_2^- peut survenir au niveau de la chaîne de transport des électrons, et plus particulièrement, via le complexe mitochondrial III, et nécessite la présence de substrats respiratoires (Nohl et al. 2000). La génération du NO peut également prendre place au niveau du complexe IV, en présence de cytochrome c et d'un faible pH (Castello et al. 2006). La concentration de l'O_2 est déterminante dans la fixation du NO_2^- au niveau de la cytochrome c oxydase, où ces deux molécules partagent le même site de liaison (Shiva 2010). Le cytochrome c, indépendamment du complexe IV, est aussi en mesure de réduire le NO_2^- en NO sous anoxie et faible pH (Basu et al. 2008). Cette réaction nécessite la fixation du cytochrome c à la membrane interne de la mitochondrie (Basu et al. 2008).

Néanmoins, la capacité de réduction du NO_2^- au sein d'un tissu serait déterminée par son activité métabolique et son contenu en NO_2^- (Curtis et al. 2012). Les voies de réduction impliquées seraient, quant à elles, dépendantes de l'expression des protéines dans le milieu et de la pression en O_2 (Curtis et al. 2012).

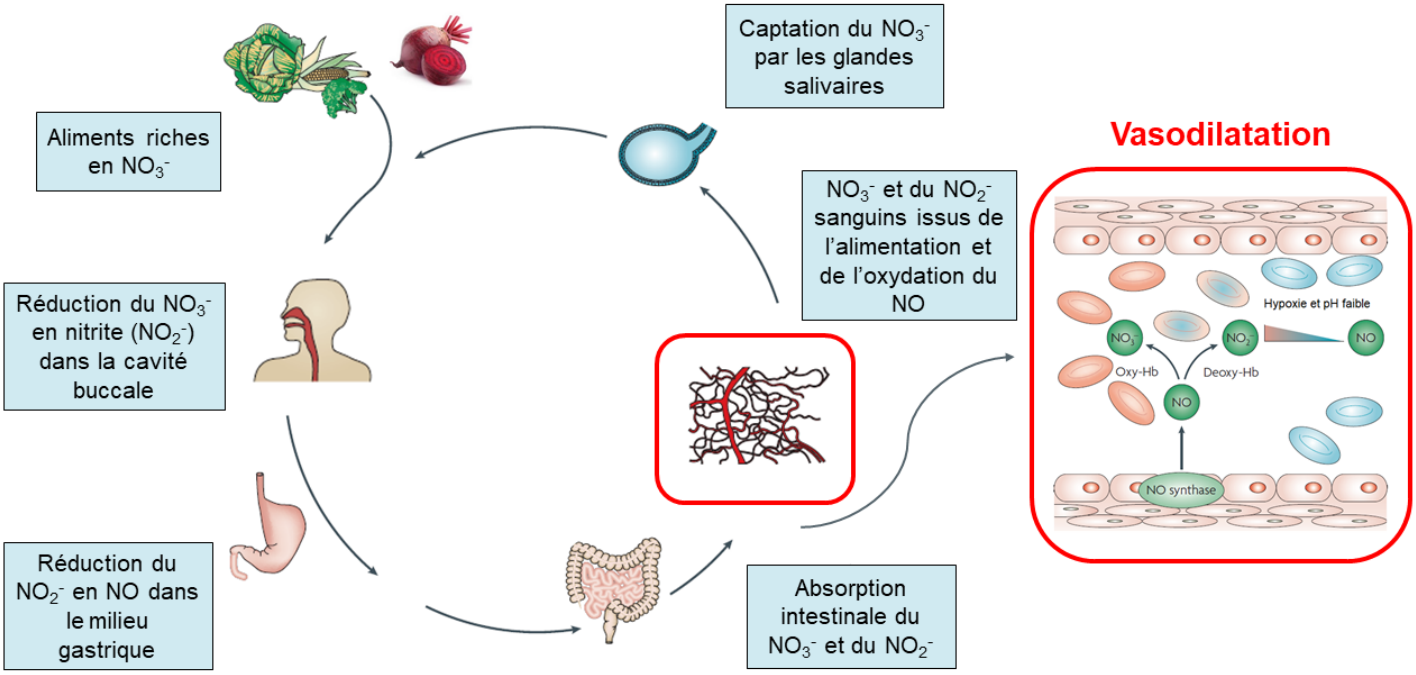


FIGURE 3. La circulation entero-salivaire du nitrate chez l'homme.

Le nitrate (NO_3^-) ingéré d'origine alimentaire est rapidement absorbé par l'intestin grêle. Alors qu'une grande partie du NO_3^- circulant est excrétée par les reins dans l'urine, jusqu'à 25 % sont captés activement par les glandes salivaires et concentrés dans la salive. Dans la cavité buccale, des bactéries commensales réduisent effectivement le NO_3^- en nitrite (NO_2^-) via l'action d'enzymes disposant d'une activité réductase. La présence de ces bactéries est requise pour la réduction du NO_3^- en NO_2^- chez le mammifère, puisque ce dernier n'est pas en mesure de réaliser cette réaction. Dans le milieu acide de l'estomac, le NO_2^- est rapidement transformé en NO et en d'autres dérivés d'oxydes d'azote. Les NO_3^- et NO_2^- restants ou issus de l'oxydation du NO au niveau gastrique sont absorbés par l'intestin et rejoignent le réservoir sanguin de NO_3^- et NO_2^-. Au sein des vaisseaux sanguins, le NO_2^- peut être converti en NO à travers sa réaction avec l'hémoglobine désoxygénée, et peut contribuer ainsi à la régulation du débit sanguin périphérique en participant à la vasodilatation, notamment sous condition hypoxique. La figure ci-dessus a été adaptée à partir de Lundberg et al. (2008).

3.2 Inhibition endogène du NO : implication de l'ADMA

La diméthylarginine asymétrique est un inhibiteur endogène de la nNOS et la eNOS (Cardounel et al. 2005, 2007). La formation de l'ADMA résulte de la méthylation post-traductionnelle de protéines contenant des résidus L-arginine (Morales et al. 2016). Au cours de la méthylation, un groupement méthyle est ajouté à l'atome d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine par les enzymes, protein arginine methyltransferases (PRMTs) (Morales et al. 2016). Il existe deux isoformes de PRMTs qui synthétisent les méthylarginines. La PRMT de type I (PRMT-I) produit la L-NMMA et l'ADMA, tandis que la PRMT de type II synthétise la L-NMMA et la diméthylarginine symétrique (SDMA) (Pope et al. 2009). La méthylation des protéines contenant des résidus L-arginine est une modification post-traductionnelle importante, et contribue notamment à la régulation de la transcription de l'ADN, de la fonction de certaines protéines, et la signalisation cellulaire (Pope et al. 2009). La PRMT-I est principalement exprimée dans l'endothélium, le cœur et les muscles lisses au niveau du système cardiovasculaire (Vallance et Leiper 2004). Son activité est stimulée dans l'endothélium, d'une part par les contraintes de cisaillement exercées par le flux sanguin, et d'autre part par les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les LDL oxydées (Wilcken et al. 2007). L'ensemble de ces stimuli conduit ainsi à une augmentation de la formation de l'ADMA (Wilcken et al. 2007). Une fois les résidus L-arginine méthylés, l'ADMA et les autres méthylarginines sont libérées dans les cellules au cours de la protéolyse (Pope et al. 2009). L'inflammation et le remodelage des tissus survenant dans les pathologies cardiovasculaires sont associées à une augmentation de la dégradation des protéines par l'autophagie et par une activité accrue des protéasomes. Ces dernières peuvent être ainsi l'une des sources de l'élévation de la concentration plasmatique de l'ADMA (Liu et al. 2016). Dans des cellules en culture, l'inhibition de l'activité des protéasomes et le blocage du processus d'autophagie réduisent significativement le niveau intracellulaire de l'ADMA (Shirakawa et al. 2011).

Toutefois, d'autres voies de synthèse de l'ADMA ont été mises en évidence récemment. La perfusion de L-arginine chez des enfants entraîne de façon aigue une élévation des concentrations plasmatiques de la L-arginine et de l'ADMA, laissant supposer qu'une partie de l'ADMA pourrait être formée à partir de L-arginine libre, et non fixée aux protéines (Kayacelebi et al. 2015). En outre, dans une population de sujets sains, âgés entre 40 et 70 ans, la consommation de thé et de végétaux est inversement corrélée avec le niveau plasmatique de l'ADMA, et ce indépendamment de l'âge, du sexe, de l'indice de masse corporelle, et de

paramètres diététiques et biochimiques (Goralczyk et al. 2012). Selon Servillo et al. (2013), certains aliments tels que la farine de fèves et de blé, les poivrons et les pommes de terre contiennent un niveau de méthylarginines dont l'ADMA, substantiellement supérieur à celui mesuré dans le plasma des sujets sains. Ainsi, l'alimentation à travers la consommation de certains fruits, végétaux et farines pourraient contribuer également à l'augmentation de la concentration plasmatique de l'ADMA.

Alors que l'ADMA a été pour la première fois isolée chez l'homme dans l'urine (Kakimoto et Akazawa 1970), l'élimination de l'ADMA par l'excrétion rénale ne représente qu'au maximum 20 % de sa dégradation totale (Achan et al. 2003). La majorité de l'ADMA produite (≈ 60 mg/ jour, Bode-Böger et al. 2007) est éliminée par l'enzyme diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH) principalement aux niveaux rénal et hépatique (Achan et al. 2003). Les deux isoformes de DDAH (type I et type II) sont exprimées dans le foie et les reins, et catalysent l'hydrolyse de l'ADMA en L-citrulline et diméthylamine (Wilcken et al. 2007). La DDAH-I est exprimée en grande partie dans les tissus exprimant la nNOS, tandis que la DDAH-II est présente majoritairement dans les tissus exprimant la eNOS (Leiper et al. 1999). Ainsi, le DDAH-2 aurait un rôle majeur dans la régulation du niveau de l'ADMA dans le cœur et les vaisseaux sanguins, alors que la DDAH-1 contribuerait principalement à la dégradation de l'ADMA dans les tissus neuronaux (Liu et al. 2016). Néanmoins, le foie semble être l'organe notable dans le maintien d'un niveau stable de concentration plasmatique de l'ADMA, avec une extraction hépatique quotidienne du foie, 700 fois supérieure à la quantité d'ADMA contenue dans le plasma (Nijveldt et al. 2003; Wilcken et al. 2007). Parmi les différentes isoformes de la DDAH, la type I est majoritairement impliquée dans la régulation de la concentration plasmatique d'ADMA, avec un taux de dégradation de l'ADMA 70 fois plus importante que celui de la DDAH-2 (Pope et al. 2009). Le blocage de la DDAH-2 n'a pas d'effet sur la concentration plasmatique d'ADMA, mais réduit la relaxation dépendante de l'endothélium de 40 % (Wang et al. 2007). Ces observations supposent une régulation complexe de l'ADMA entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, pouvant particulièrement affecter l'action de l'ADMA sur la biodisponibilité du NO. Par ailleurs, d'autres voies métaboliques sont capables de dégrader les méthylarginines, sachant qu'une diminution de l'expression de la DDAH-1 et -2 de plus de 80 %, ne supprime pas totalement le métabolisme des méthylarginines (Pope et al. 2009). L'ADMA peut également être métabolisée par l'enzyme, alanine-glyoxylate aminotransférase 2 (AGXT2), et sa transamination donne l'alpha-keto-delta-(N^G, N^G-

diméthylguanidine) acide valérique (DMGV), laquelle est excrétée par les reins (Rodionov et al. 2014).

L'ADMA semble principalement agir à travers son action d'inhibition de la NOS, en entrant en compétition avec le précurseur, L-arginine (Cooke 2000). Cette inhibition a été confirmée expérimentalement lors de la perfusion d'ADMA chez des sujets sains, à des doses correspondant aux concentrations plasmatiques rencontrées chez les patients ayant une pathologie cardiovasculaire (Kielstein et al. 2004). L'ADMA cause une augmentation de la résistance vasculaire et une diminution du débit cardiaque, tous deux accompagnées d'une concentration moindre de guanosine monophosphate cyclique (cGMP), le principal messager du NO impliqué dans le processus de vasodilatation (Kielstein et al. 2004).

La concentration plasmatique d'ADMA mesurée dans des populations saines est comprise entre 0,29-0,63 µmol/L, et augmente avec le vieillissement (Blackwell et al. 2007). La concentration plasmatique d'ADMA est au minimum 2 fois plus importante chez les sujets à risque cardiovasculaire, et jusqu'à 9 fois supérieure chez les patients ayant une insuffisance rénale, comparativement aux valeurs observées chez les sujets sains (Cooke 2004). En outre, l'accumulation d'ADMA dans le milieu intracellulaire s'accroît à un niveau 3 à 7 fois supérieur à la dose d'ADMA incubée dans des cellules endothéliales (de 0,5µmol à 10 µmol, Cardounel et al. 2007). Le contenu intracellulaire de L-arginine s'exprime en mmol, alors que la constante de Michaelis pour ce substrat est de 2,9 µmol/L, ce qui est 25 à 30 fois supérieur aux niveaux plasmatiques de L-arginine rapportés chez des populations saines et pathologiques (Bode-Böger et al. 2007). A contrario, malgré des niveaux intracellulaires moindres, l'ADMA présente un potentiel d'inhibition fonctionnelle de la NOS avec une constante d'inhibition (Ki) de 0,9 µmol/L (Cardounel et al. 2007). Ces résultats confortent le concept du «paradoxe de la L-arginine » : la supplémentation en L-arginine est en mesure d'augmenter la biodisponibilité du NO, alors que la L-arginine endogène est déjà en quantité suffisante pour saturer l'activité de l'ensemble des isoformes de la NOS (Bode-Böger et al. 2007). Ainsi, l'ADMA pourrait inhiber 30 à 70 % de la synthèse du NO, lorsque sa concentration plasmatique atteint des niveaux observés chez des populations pathologiques ou à risque cardiovasculaire (Wilcken et al. 2007).

L'ADMA apparaît comme la méthylarginine ayant le plus grand potentiel d'inhibition de la NOS in vivo, au vu de ces niveaux de concentrations plasmatiques. La SDMA ne représente que 50 % du niveau de la concentration plasmatique d'ADMA, avec des limites comprises entre 0,23 et 0,53 µmol/L (Schwedhelm et al. 2011). Bode-Böger et al. (2006)

montrent que l'incubation de SDMA dans le milieu de cellules endothéliales diminue, de façon dose dépendante, la synthèse de NO, en limitant l'apport de L-arginine à la NOS. Les méthylarginines partagent le même processus de transport transcellulaire avec la L-arginine, par l'intermédiaire des transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs), pouvant ainsi faire émerger une compétition dans les échanges intra- et extra-cellulaires entre la L-arginine et les méthylarginines (Teerlink et al. 2009). La L-NMMA est aussi capable d'inhiber directement la synthèse du NO à travers la eNOS et la nNOS (Cardounel et al. 2005, 2007), mais sa concentration plasmatique est 10 fois inférieure à celle de l'ADMA (Vallance et al. 1992). Par ailleurs, l'ADMA altère aussi la synthèse du NO, indépendamment de son inhibition directe de la NOS, et de sa compétition avec la L-arginine pour l'entrée dans le milieu intracellulaire. L'incubation de l'ADMA dans des artérioles isolées de muscle de rat élimine la dilatation dépendante du NO, et augmente le tonus basal des muscles lisses, lequel résulte d'une production accrue d'anions superoxydes (O_2^-) (Toth et al. 2007). L'O_2^- réduit la biodisponibilité du NO, en l'inactivant à travers sa réaction avec le NO, donnant comme produit le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Förstermann et Sessa 2012). L'ADMA est aussi négativement associée à la phosphorylation de la eNOS au niveau de la Sérine^{1177} dans l'aorte de souris saines après une néphrectomie (Kajimoto et al. 2012). Les souris surexprimant la DDAH-1, la principale enzyme métabolisant l'ADMA, présentent une phosphorylation de la Sérine^{1177} de la eNOS non altérée, et un niveau d'ADMA réduit après la même intervention (Kajimoto et al. 2012).

En conclusion, une augmentation de la concentration plasmatique d'ADMA, à des niveaux atteints dans des pathologies cardiovasculaires, peut conduire à une diminution de la biodisponibilité du NO à travers les différents mécanismes cellulaires décrits précédemment.

4. Biodisponibilité du NO dans le cadre de l'exercice

4.1 Effets de la supplémentation en NO_3^- dans le cadre de l'exercice

La supplémentation en NO_3^- permet d'augmenter les concentrations plasmatiques de NO_3^- de plus de 10 fois et de NO_2^- de plus de 3 fois, 30 min et 90 min après l'ingestion de sels de nitrate ($NaNO_3$), respectivement (Lundberg et Govoni 2004). Concernant la pharmacocinétique, la supplémentation en $NaNO_3$ ou en jus de betterave rouge, riche en NO_3^-, conduit à une élévation maximale de la concentration plasmatique de NO_3^- et de NO_2^-, environ 1h30 et 3h après l'ingestion, respectivement (Webb et al. 2008; Govoni et al. 2008). La pharmacocinétique de la supplémentation en NO_3^- influe sur sa pharmacodynamique, de sorte que la dose du traitement et le temps de la prise de mesure interagissent sur la réduction de la pression artérielle systolique et diastolique après une supplémentation en jus de betterave rouge (Wylie et al. 2013a). Ainsi, l'apport de NO_3^- d'origine alimentaire permet effectivement d'élever le réservoir endogène de NO dans le compartiment vasculaire, en augmentant la concentration plasmatique de NO_3^- et NO_2^-. La réduction finale du NO_2^- peut prolonger la biodisponibilité du NO, notamment sous condition hypoxique et de pH faible (Jensen 2009). En outre, alors que ce sont surtout le sang et le foie qui sont considérés comme les sites contribuant majoritairement au métabolisme du NO, une concentration intramusculaire élevée de NO_3^- a été trouvée dans les muscles de rats et de souris. Ces auteurs ont ainsi suggéré que le muscle squelettique servirait de réservoir de NO_3^-, lequel pouvant être réduit directement en NO_2^- puis en NO, ou contribuer aux niveaux plasmatiques de NO_3^- (Piknova et al. 2015). Chez l'homme, une étude récente rapporte une concentration basale de NO_3^- au niveau musculaire supérieure à celle mesurée au niveau plasmatique chez des sujets sains jeunes et âgés, ainsi que chez des individus ayant un diabète de type 2 (Nyakayiru et al. 2017b). Dans cette même étude, l'ingestion de $NaNO_3$ induit une élévation de la concentration plasmatique du NO_3^- et NO_2^- chez les diabétiques de type 2, mais également une augmentation de la concentration intramusculaire du NO_3^- comparativement au traitement placebo (Nyakayiru et al. 2017b). Ces observations supportent l'apport en NO_3^- d'origine alimentaire en tant qu'une voie alternative de synthèse du NO. Par ailleurs, la conversion effective du NO_2^- en NO, au cours de l'exercice, a été confirmée par une élévation de la consommation du NO_2^- et de la production d'hémoglobine nitrosylée, un index de formation du NO au niveau vasculaire (Hon et al. 2016). Cette réduction du NO_2^- en NO est accompagnée d'une augmentation du débit cardiaque et d'une réduction de la pression artérielle moyenne, qui sont attribuées à une vasodilatation

systémique induite par la perfusion de NO_2^- (Hon et al. 2016). Ainsi, le NO_2^- apparaît être fonctionnel dans le renforcement de la bioactivité du NO dans le cadre de l'exercice.

Une faible disponibilité en O_2 limite la capacité à soutenir la dépense énergétique à l'exercice dans différentes conditions, telles que les pathologies cardiovasculaires, l'environnement hypoxique ou chez les athlètes lorsque leur capacité maximale de transport de l'O_2 est atteinte lors de l'exercice d'intensité élevée (Maltais et al. 1996; Amann 2012; Poole et al. 2012). Comme susmentionné, la production de NO via la NO synthase dépend de la L-arginine et de la pression en O_2, et peut être en conséquence limitée sous hypoxie (Förstermann et Sessa 2012). En revanche, la formation de NO via la réduction du NO_2^- est renforcée par la désoxyhémoglobine et la désoxymyoglobine en condition hypoxique (Cosby et al. 2003; Shiva et al. 2007), et sa production est dépendante du pH (Modin et al. 2001). De telles conditions peuvent être réunies au sein du muscle actif. En raison de ses caractéristiques, la réduction du NO_2^- en NO est apparue comme une voie de signalisation impliquée dans la vasodilatation en condition acido-hypoxique, et dans la régulation de la respiration mitochondriale (Brown 2001; Gladwin et al. 2005; Lundberg et al. 2008). La disponibilité en O_2 pour les muscles actifs est déterminée par l'équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 au niveau tissulaire. Ces 2 derniers facteurs peuvent être sérieusement altérés dans certaines pathologies chroniques comme l'insuffisance cardiaque (Poole et al. 2012). Toutefois, les moyens pharmacologiques ou nutritionnels capables de réduire la demande métabolique au repos ou à l'exercice sont limités (Larsen et al. 2007).

4.1.1 Effets de la supplémentation en NO_3^- sur le coût en O_2 à l'exercice

De nombreuses études ont rapporté une diminution du coût en O_2 à la suite d'une supplémentation en NO_3^- au cours d'un exercice d'intensité modérée (Larsen et al. 2007; Bailey et al. 2009, 2010; Vanhatalo et al. 2010; Larsen et al. 2011a; Lansley et al. 2011b; Cermak et al. 2012; Wylie et al. 2013a; Bond et al. 2014; Carriker et al. 2016; Wylie et al. 2016b), élevée (Larsen et al. 2007; Cermak et al. 2012; Muggeridge et al. 2013; Bond et al. 2014; Carriker et al. 2016) et difficile (Larsen et al. 2007; Bailey et al. 2010; Lansley et al. 2011b; Bond et al. 2014) chez des sujets jeunes et sains. Une réduction du $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice, à une intensité modérée, a également été observée à la suite d'une alimentation riche en NO_3^-

comparativement à un apport alimentaire pauvre en NO_3^- (Porcelli et al. 2016). Une amélioration de l'efficience musculaire à la suite de la supplémentation en NO_3^- peut être due à une diminution du coût en O_2 de la resynthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) (Larsen et al. 2011a) et/ou à une réduction du coût en ATP de la contraction musculaire (Bailey et al. 2010). L'efficience mitochondriale est étroitement liée au non couplage de la respiration mitochondriale, où la fuite de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale conduit à une dissipation de l'énergie, non couplée à la synthèse d'ATP (Brand 2005). La respiration non couplée représente jusqu'à 20-25% du métabolisme basal ; elle peut être augmentée lors de l'exercice et représentée jusqu'à 35 % du $\dot{V}O_2$ (Brand 2005). D'un point de vue mécanistique, le NO réduit la fuite des protons au niveau des complexes mitochondriaux, augmentant ainsi l'efficience de la phosphorylation oxydative (Clerc et al. 2007). Le NO_2^- seul peut servir comme accepteur final d'électron dans la chaîne respiratoire mitochondriale, réduisant ainsi le besoin en O_2 pour la resynthèse d'ATP (Basu et al. 2008). En outre, une supplémentation en $NaNO_3^-$ de 3 jours réduit le $\dot{V}O_2$ à l'exercice sous-maximal, chez des sujets jeunes et sains (Larsen et al. 2011a). Cette réduction du coût en O_2 est corrélée à une augmentation de la production d'ATP par molécule d'O_2 consommé, production mesurée in vitro à partir de biopsies musculaires (Larsen et al. 2011a). L'efficience mitochondriale rapportée est liée à une diminution de l'expression de protéines impliquées dans la conductance des protons à travers la membrane interne mitochondriale (Larsen et al. 2011a). Toutefois, une supplémentation en jus de betterave rouge de 7 jours diminue la $\dot{V}O_2$ durant l'exercice d'intensité élevée chez des sujets jeunes et sains, sans aucun effet sur les marqueurs principaux de l'efficience mitochondriale (Whitfield et al. 2016). Ainsi, la supplémentation en jus de betterave rouge peut améliorer l'efficience musculaire, indépendamment d'une modulation de la respiration mitochondriale. Une réduction du coût en ATP de la contraction musculaire pourrait limiter l'accumulation de métabolites, comme l'ADP et le Pi, lors de l'exercice, contribuant ainsi à diminuer la stimulation de la phosphorylation oxydative (Brown 1992; Bose et al. 2003). Une supplémentation en jus de betterave rouge de 6 jours diminue le $\dot{V}O_2$ et la dégradation de la créatine phosphate (PCr) lors d'extensions de la jambe à intensité modérée et difficile (Bailey et al. 2010). Ces effets sont accompagnés d'une diminution du renouvellement de l'ATP au sein du muscle, avec une réduction de l'accumulation d'adénine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) au cours des exercices (Bailey et al. 2010). Les structures engagées dans l'amélioration de l'efficience contractile à la suite de la supplémentation en NO_3^- ne sont pas encore identifiées. Dans le muscle squelettique, l'ATP

produite lors de la contraction musculaire sert à différents processus physiologiques : l'interaction actine-myosine, la recaptation du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, et le maintien de la polarité membranaire à travers les pompes sodium-potassium (Barclay et al. 2007). La réduction du coût en O_2 et les mécanismes susceptibles d'en être responsables peuvent être également impliqués dans l'amélioration de la tolérance à l'effort.

4.1.2 Effets de la supplémentation en NO_3^- sur la tolérance à l'effort

La supplémentation en jus de betterave rouge améliore la tolérance à l'effort, pour des exercices d'intensité difficile, chez des sujets jeunes et sains (Bailey et al. 2009, 2010; Lansley et al. 2011b; Wylie et al. 2013a; Kelly et al. 2013b; Breese et al. 2013). L'amélioration de la tolérance à l'effort pourrait résulter d'une stabilité métabolique renforcée (Grassi et al. 2011), induisant ainsi une réduction des perturbations métaboliques, et une augmentation de la résistance à la fatigue (Allen et al. 2008). La supplémentation en jus de betterave rouge peut réduire les perturbations métaboliques, à travers l'atténuation de la dégradation de phosphocréatine (PCr), de l'accumulation de Pi et de la chute de pH, au cours d'un exercice d'intensité difficile en condition hypoxique (Vanhatalo et al. 2011). En outre, la supplémentation en betterave rouge diminue l'amplitude de la composante lente de PCr (Bailey et al. 2010), et du $\dot{V}O_2$, lors de l'exercice d'intensité difficile (Bailey et al. 2009, 2010). La composante lente du $\dot{V}O_2$ apparaît dans des domaines d'intensité d'élevée à difficile, et correspond à l'atteinte d'un $\dot{V}O_2$ supérieur à celui prédit (Jones et Poole 2005). L'apparition de cette composante lente coïncide temporellement avec le recrutement additionnel de fibres musculaires (Krustrup et al. 2004). Ce recrutement peut être le reflet d'une diminution de l'efficience musculaire avec l'augmentation de l'intensité de l'exercice (Jones et Poole 2005). La diminution de la dégradation de la PCr et de l'amplitude de la composante lente du $\dot{V}O_2$ pourraient être des phénomènes manifestant une amélioration de la stabilité métabolique, laquelle contribuerait à une élévation de la tolérance à l'effort (Grassi et al. 2011). L'équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 peut maintenir la stabilité mitochondriale, en préservant le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (Grassi et al. 2011). Chez le rat, la perfusion du muscle avec du sel de nitrite ($NaNO_2$) augmente l'équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2, conduisant à une élévation de la pression en O_2 au niveau microvasculaire au repos, et à une atténuation de sa baisse au début de la contraction musculaire (Colburn et al. 2017). Chez

l'homme, la supplémentation en betterave rouge diminue la composante lente du $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité élevée, chez des sujets jeunes et sains (Breese et al. 2017). Cette baisse est corrélée négativement à une augmentation de l'extraction en O_2 et du volume sanguin, à travers les différents vastes du quadriceps (Breese et al. 2017). Ces résultats montrent que la supplémentation en NO_3^- est en mesure d'élever la disponibilité en O_2 afin d'obtenir un meilleur équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2. Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de l'augmentation de la disponibilité en O_2. La respiration mitochondriale peut être inhibée par la fixation du NO au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire (Brown 2001). L'inhibition de la respiration mitochondriale permet d'étendre le gradient de pression en O_2 au sein du muscle, à travers l'inhibition des fibres musculaires proches des capillaires (Shiva 2010). L'augmentation de la diffusion de l'O_2 vers les fibres musculaires les plus profondes permet d'accroître la quantité d'ATP produite sur une plus large densité de mitochondries (Shiva 2010). La supplémentation en NO_3^- peut aussi contribuer à l'élévation de la disponibilité en O_2, à travers une augmentation de la perfusion musculaire au sein des muscles actifs. Une supplémentation en jus de betterave rouge de 5 jours permet de restaurer la perfusion musculaire et la tolérance à l'effort, chez des sujets jeunes et sains au cours de l'exercice, lorsque la pression de perfusion au niveau des muscles actifs est altérée (Bentley et al. 2017). De plus, une prise aigue de jus de betterave rouge réduit l'activité sympathique centrale au repos et au cours de l'exercice, chez des sujets jeunes et sains ayant une tension artérielle dans les normes attendues (Notay et al. 2017). Ainsi, la supplémentation en NO_3^- induit les effets hémodynamiques attribués à une augmentation de la biodisponibilité du NO, notamment par le biais d'une vasodilatation périphérique et d'une sympatholyse centrale. Par conséquent, une augmentation du débit sanguin et/ou un meilleur couplage entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 pourraient renforcer la stabilité métabolique, en augmentant la disponibilité en O_2 (Zoladz et al. 2006), retardant ainsi le développement du processus de fatigue musculaire.

4.1.3 Effet de l'aptitude aérobie sur les propriétés ergogéniques de la supplémentation en NO_3^-

Plusieurs études ne rapportent pas de réduction du coût en O_2 lors d'exercices d'intensité sous-maximale à la suite d'une supplémentation en NO_3^- comparativement au traitement placebo (Peacock et al. 2012; Christensen et al. 2013; Breese et al. 2013; Thompson et al. 2014;

Boorsma et al. 2014; MacLeod et al. 2015; Sandbakk et al. 2015; Nyakayiru et al. 2017c; Nybäck et al. 2017). L'absence d'effets de la supplémentation en NO_3^- est principalement observée dans des populations de sujets entraînés en endurance, présentant un $\dot{V}O_{2max}$ compris entre 60 et 80 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ (Peacock et al. 2012; Christensen et al. 2013; Boorsma et al. 2014; MacLeod et al. 2015; Sandbakk et al. 2015; Nyakayiru et al. 2017c; Nybäck et al. 2017). Porcelli et al. (2015) montrent que l'aptitude aérobie altère l'effet ergogénique de la supplémentation en NO_3^- dans une population d'individus ayant un $\dot{V}O_{2max}$ compris entre 28,2 et 81,7 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$. Après une supplémentation de 6 jours de $NaNO_3$, le $\dot{V}O_{2max}$ est négativement corrélé avec la réduction du coût en O_2 au cours de l'exercice d'intensité modérée, et avec la performance réalisée à un contre-la-montre de 3 km (Porcelli et al. 2015). Les sujets ayant une aptitude aérobie élevée ont également une réponse moindre à la supplémentation en NO_3^- au niveau de la concentration plasmatique de NO_3^- et NO_2^- (Porcelli et al. 2015). Carriker et al. (2016) rapportent une réduction du coût en O_2 lors d'exercices d'intensités inférieures à 60 % du $\dot{V}O_{2max}$, chez des sujets ayant une aptitude aérobie faible ($\dot{V}O_{2max}$ < 45 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$), après une supplémentation en jus de betterave rouge de 4 jours. Aucun changement au niveau du $\dot{V}O_2$ n'était observé chez des sujets ayant une aptitude aérobie élevée ($\dot{V}O_{2max}$ > 60 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$), à la suite de la même supplémentation (Carriker et al. 2016). Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer l'absence d'effet de la supplémentation en NO_3^- chez les sujets présentant une aptitude aérobie élevée. Les athlètes ont des niveaux plasmatiques de NO_3^- et de NO_2^- au repos supérieurs à ceux mesurés chez les sujets sédentaires (Jungersten et al. 1997; Totzeck et al. 2012). Ce réservoir endogène accru de NO_3^- et de NO_2^- chez les sujets présentant une aptitude aérobie élevée pourrait diminuer leur sensibilité à la supplémentation en NO_3^-, ou nécessiter des modalités de traitement différentes de celles qui sont fonctionnelles chez les sujets sédentaires ou modérément entraînés. Les adaptations physiologiques liées à l'entraînement en endurance peuvent également limiter la survenue d'un environnement hypoxique et acide dans le muscle actif, lequel est propice à la réduction du NO_2^- en NO. L'entraînement en endurance accroît la densité des capillaires dans les fibres musculaires de types 1 et 2, et augmente la capacité oxydative des fibres de type 2 (Jensen et al. 2004; Hopker et al. 2009). Les sujets entraînés en endurance présentent une distribution du débit sanguin plus homogène au cours de l'exercice par rapport aux individus sédentaires (Kalliokoski et al. 2001). Une architecture vasculaire optimale et un contrôle neural précis du débit sanguin à la suite de l'entraînement peuvent contribuer à une réduction de la quantité de sang distribué dans les muscles non actifs (Hellsten et Nyberg 2015). Ainsi, une meilleure disponibilité en O_2 au niveau

musculaire, émanant d'adaptations à l'entraînement, pourrait favoriser la production de NO à travers la NO synthase, dont l'activité dépend de l'O_2 (Förstermann et Sessa 2012). Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation du contenu protéique de eNOS et de nNOS, trouvée chez des sujets sédentaires à la suite d'un programme d'entraînement (Frandsen et al. 2000; McConell et al. 2007). Toutefois, les effets de la supplémentation en NO_3^- semblent être possibles chez des sujets entraînés, présentant une aptitude aérobie élevée, lorsque l'exercice est réalisé dans des conditions favorisant la réduction du NO_2^- en NO. Shannon et al. (2016) rapportent une réduction du $\dot{V}O_2$ lors d'un exercice d'intensité modérée, et une amélioration de la performance à un contre-la-montre de 1500 m sous condition hypoxique après une supplémentation en jus de betterave rouge, chez des sujets ayant une large distribution de $\dot{V}O_{2max}$, compris entre 47,1 et 76,8 mL.min^{-1}.kg^{-1}. Aucune relation n'est observée entre le niveau de $\dot{V}O_{2max}$ et l'amélioration de la performance suivant la supplémentation en jus de betterave rouge (Shannon et al. 2016).

4.1.4 Effets de la supplémentation en NO_3^- sur l'exercice d'intensité supramaximale

Les effets ergogéniques des supplémentations en NO_3^- ont également été étudiés lors des exercices intermittents d'intensité supramaximale, notamment les répétitions de sprint. Les études ont donné lieu à des résultats contradictoires. Plusieurs études ont montré une amélioration de la performance lors d'exercices intermittents d'intensité supramaximale à la suite d'une supplémentation en jus de betterave rouge, chez des sujets pratiquant des sports collectifs (Wylie et al. 2013b; Thompson et al. 2015; Aucouturier et al. 2015; Wylie et al. 2016a; Thompson et al. 2016; Nyakayiru et al. 2017a). Cependant, deux autres études ne rapportent pas d'effet de la supplémentation en jus de betterave rouge sur la performance au cours d'exercices intermittents supramaximaux, l'une chez des athlètes de sports collectifs ($\dot{V}O_{2max}$: ≈ 53 mL.min^{-1}.kg^{-1}) (Martin et al. 2014), et l'autre chez des cyclistes bien entraînés ($\dot{V}O_{2max}$: ≈ 72 mL.min^{-1}.kg^{-1}) (Christensen et al. 2013). L'exercice intermittent supramaximal entraîne un recrutement substantiel des fibres musculaires de type 2, selon le principe de la taille de Henneman (Krustrup et al. 2004; Breese et al. 2013). Les fibres musculaires de type 2 se caractérisent par une extraction de l'O_2 plus importante pour un même niveau d'activation

du métabolisme oxydatif (Behnke et al. 2003), et par un déséquilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 comparativement aux fibres musculaires de type 1 (McDonough et al. 2005). Le recrutement de ces fibres musculaires de type 2 peut donc aboutir au développement d'un environnement hypoxique et acide au sein du muscle actif, et favoriser in fine la réduction du NO_2^- en NO (Lundberg et Weitzberg 2010; Wylie et al. 2013b). En outre, les fibres musculaires de type 2 sont davantage sensibles aux variations de biodisponibilité du NO, rendant ainsi la supplémentation en NO_3^- plus effective au cours de l'exercice intermittent supramaximal, ou dans certaines populations pathologiques, auprès desquelles une forte contribution des fibres musculaires de type 2 à l'exercice compromet la tolérance à l'effort (Poole et al. 2012; Jones et al. 2016). La supplémentation en NO_3^- s'est avérée augmenter la force musculaire (Hernández et al. 2012), la perfusion microvasculaire (Ferguson et al. 2013a), et la disponibilité en O_2 (Ferguson et al. 2015), au niveau des muscles avec une proportion élevée de fibres musculaires de type 2 chez le rongeur, sans modification de ces variables dans les muscles avec une proportion élevée de fibres musculaires de type 1.

Nous avons précédemment observé une amélioration de la performance chez des sujets pratiquant des sports collectifs ($\dot{V}O_{2max}$: 46,6 ± 3,4 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$), au cours d'un exercice intermittent supramaximal, après une supplémentation en jus de betterave rouge de 3 jours (Aucouturier et al. 2015). L'exercice intermittent supramaximal était composé d'une période active de 15 s à 170 % de la puissance maximale aérobie, et d'une récupération passive de 30 s. L'effet ergogénique de la supplémentation en NO_3^- était accompagné d'un maintien de la perfusion musculaire et de moindres fluctuations du $\dot{V}O_2$ lors de la répétition des sprints (Aucouturier et al. 2015). Ces résultats suggèrent que le maintien de la perfusion musculaire et de l'apport en O_2 à un niveau supérieur sous supplémentation en NO_3^-, pourrait accélérer la resynthèse de PCr, et prolonger la capacité à répéter les sprints.

La resynthèse de la PCr est déterminée par la capacité maximale de la phosphorylation oxydative (Blei et al. 1993), et dépend de la disponibilité en O_2 (Haseler et al. 1999). Vanhatalo et al. (2014) supportent cette hypothèse en rapportant qu'une supplémentation de 5 jours en jus de betterave rouge accélère la cinétique de récupération de la PCr chez des sujets jeunes et sains, après un exercice d'extension de la jambe en condition hypoxique. Ce taux accru de resynthèse de la PCr est corrélé, en condition hypoxique, avec un renforcement de l'apport en O_2, à la suite de la supplémentation en jus de betterave rouge (Vanhatalo et al. 2014). L'augmentation de l'apport en O_2 post-exercice est également observée sous condition de

normoxie, après l'ingestion du jus de betterave rouge (Vanhatalo et al. 2014). Par conséquent, l'ensemble de ces travaux met en évidence l'effet ergogénique de la supplémentation en NO_3^- lors d'exercices intermittents supramaximaux chez des sujets présentant un $\dot{V}O_{2max} \leq 55$ $mL.min^{-1}.kg^{-1}$. Cependant, malgré des conditions favorables à la formation du NO via la réduction du NO_2^-, lors de l'exercice intermittent supramaximal, peu de travaux se sont intéressés aux effets de la supplémentation en NO_3^- dans cette modalité d'exercice chez des sujets entraînés en endurance, présentant une aptitude aérobie élevée ($\dot{V}O_{2max} > 65$ $mL.min^{-1}.kg^{-1}$).

4.2 Effets de l'ADMA dans le cadre de l'exercice

L'ADMA est un facteur prédictif indépendant de mortalité toutes causes confondues, mais également des événements cardiovasculaires (Maas et Böger 2003). La diminution du risque cardiovasculaire liée à l'activité physique résulte d'adaptations physiologiques protégeant directement le système vasculaire (Joyner et Green 2009). Ces bénéfices sont indépendants des facteurs de risques cardiovasculaires traditionnellement considérés (Joyner et Green 2009). Les effets protecteurs de l'activité physique pourraient être principalement expliqués par une amélioration de la fonction endothéliale et du contrôle du système nerveux autonome, les 2 étant en partie régulés par la biodisponibilité du NO (Joyner et Green 2009). L'interaction entre la fonction endothéliale et l'activité sympathique a été étudiée chez des sujets jeunes et sains, présentant différents niveaux basaux d'activité sympathique musculaire (Charkoudian et al. 2006). Après la perfusion d'un inhibiteur de la NOS, les sujets ayant une activité sympathique musculaire élevée montrent une augmentation de leur tension artérielle supérieure à celle observée chez les sujets ayant une activité sympathique musculaire faible (Charkoudian et al. 2006). Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la vasodilatation dépendante du NO exacerbe les effets délétères d'une activité sympathique accrue sur le système cardiovasculaire. En outre, une concentration plasmatique d'ADMA élevée peut contribuer à une dérégulation de la fonction endothéliale et de l'activité sympathique, participant ainsi au développement de pathologies cardiovasculaires (Böger 2006; Poole et al. 2012). Une concentration plasmatique d'ADMA élevée est associée à une faible valeur de la dilatation dépendante du débit sanguin (FMD) dans des populations présentant ou non des risques cardiovasculaires (Böger et al. 1998; Ardigo et al. 2007). De plus, la perfusion d'ADMA

accroît l'activité sympathique chez des rats conscients et dénervés, empêchant toute compensation de l'activité baroréflexe sur le système nerveux sympathique (Augustyniak et al. 2006). L'ADMA pourrait moduler l'effet du NO dans la perfusion musculaire à l'exercice, et altérer les adaptations vasculaires dépendantes du NO à l'issue de l'entraînement, pouvant ainsi affecter le $\dot{V}O_{2max}$. Pour étayer cette hypothèse, Green et al. (2004a) montrent une amélioration de la FMD dans l'artère brachiale et une augmentation du $\dot{V}O_{2max}$ à la suite de programmes d'entraînement en endurance, réalisés auprès de 182 sujets regroupés à partir de 13 études. L'ampleur de l'amélioration post-entraînement de la FMD est liée à un faible niveau d'aptitude aérobie initial, et n'est pas corrélée aux changements observés au niveau des facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels (Green et al. 2004a).

4.2.1 Effet de l'entraînement sur les niveaux de concentration d'ADMA

Plusieurs études ont indiqué une diminution du niveau sanguin d'ADMA à la suite d'un programme d'entraînement chez des patients ayant des pathologies cardiovasculaires (Schlager et al. 2011; Teplan et al. 2014), des désordres métaboliques (Mittermayer et al. 2005; Gomes et al. 2008; Hanssen et al. 2011), et chez des individus présentant des risques cardiovasculaires (Turiel et al. 2011; Tanahashi et al. 2014a; Riccioni et al. 2015). Une diminution de la concentration plasmatique d'ADMA est également décelée après une prise en charge basée sur un programme d'entraînement et un régime alimentaire chez des adultes et des enfants obèses et en surpoids (Koncsos et al. 2011; Maeda et al. 2013). Seules deux études ne montrent pas d'effet de l'entraînement sur la concentration plasmatique d'ADMA chez des sujets présentant une insuffisance cardiaque chronique, malgré une augmentation de l'aptitude aérobie (Niebauer et al. 2005; Seljeflot et al. 2011). Dans l'une de ces études, l'entraînement est basé sur un programme d'exercices à domicile, et les niveaux plasmatiques d'ADMA ne diffèrent pas entre les patients et les sujets servant de contrôle (Niebauer et al. 2005). Dans l'étude de Seljeflot et al. (2011), l'entraînement consiste en un circuit d'exercices, dont l'intensité est fixée à l'aide d'une échelle subjective de perception de l'effort, l'échelle de Borg. Néanmoins, la concentration plasmatique d'ADMA diffère selon la sévérité de l'insuffisance cardiaque des patients, avant l'entraînement (Seljeflot et al. 2011). L'absence d'effet de l'intervention sur l'ADMA pourrait être notamment expliquée par les modalités d'exercices sélectionnées lors de

l'entraînement, qui sont toutefois suffisantes pour améliorer l'aptitude aérobie chez ces patients déconditionnés (Niebauer et al. 2005; Seljeflot et al. 2011). L'ADMA semble particulièrement sensible à l'entraînement en endurance dans des populations, où la synthèse du NO peut être altérée. Chez des sujets diabétiques de type 1, la concentration plasmatique d'ADMA pré-entraînement est supérieure par rapport aux contrôles, mais est restaurée au niveau de celle mesurée chez les sujets sains après 2 et 4 mois d'un entraînement en endurance (Mittermayer et al. 2005). Chez ces patients, la concentration plasmatique d'ADMA retourne aux valeurs mesurées initialement, 8 mois après l'arrêt du programme d'entraînement (Mittermayer et al. 2005). En outre, un entraînement de 6 mois réduit la concentration sérique d'ADMA chez des patients ayant une artériopathie des membres inférieurs, comparativement à un groupe de patients présentant la même pathologie, mais n'ayant suivi que le traitement médicamenteux recommandé (Schlager et al. 2011). L'entraînement est accompagné d'une amélioration de la distance maximale de marche (Schlager et al. 2011), qui pourrait particulièrement s'expliquer par un meilleur équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 dans cette population (Haas et al. 2012). Les bénéfices de l'entraînement sur la distance maximale de marche sont maintenus 6 mois après l'arrêt du programme d'entraînement, tandis que la concentration sérique d'ADMA reste significativement différente entre les deux groupes (Schlager et al. 2011). Ainsi, l'ADMA pourrait être impliquée dans le maintien de la fonction vasculaire après l'entraînement, et contribuer ainsi à rétablir l'apport en O_2, notamment auprès de populations où celui-ci peut être atténué. Certaines associations entre les changements du niveau sanguin d'ADMA et les améliorations structurales et fonctionnelles au niveau vasculaire semblent supporter cette hypothèse. Deux études montrent une corrélation entre la diminution de la concentration plasmatique d'ADMA et l'amélioration de la rigidité artérielle après une période d'entraînement chez des femmes ménopausées (Tanahashi et al. 2014a), et chez des adultes obèses et en surpoids (Maeda et al. 2013). Hanssen et al. (2011) observent une altération du rapport entre le diamètre artériolaire et veinulaire chez des sujets obèses comparativement au rapport relevé chez les sujets minces. Cette altération est accompagnée d'une tendance vers une concentration sérique d'ADMA supérieure chez les individus obèses. Alors même que l'aptitude aérobie est corrélée au rapport entre les diamètres artériolaire et veinulaire, un programme d'entraînement normalise ce rapport chez les sujets obèses, à celui mesuré chez les individus minces. Après l'entraînement, la dilatation artériolaire est également renforcée, mais uniquement chez les sujets obèses, et s'accompagne d'une réduction significative de la concentration sérique d'ADMA. Ces résultats suggèrent que l'ADMA pourrait participer à

l'amélioration de la fonction et de la structure vasculaires chez des sujets présentant un $\dot{V}O_{2max}$ faible et/ou un niveau sanguin élevé d'ADMA.

4.2.2 Relation entre l'ADMA et l'aptitude aérobie dans le cadre de pathologies chroniques ou de populations à risques cardiovasculaires

Dans le cadre de pathologiques chroniques, une diminution de la vasodilatation dépendante du NO pourrait induire une réduction du débit sanguin et de l'apport en O_2 aux muscles actifs, limitant ainsi l'aptitude aérobie. Chez la souris ayant une hypercholestérolémie ou ingérant un inhibiteur de la NOS, la réduction de la production du NO est associée à une altération de la distribution du débit sanguin aux muscles actifs, et à une diminution du $\dot{V}O_{2max}$, comparativement aux souris contrôles (Maxwell et al. 1998). Un entraînement de 4 semaines améliore le $\dot{V}O_{2max}$ et la production du NO chez des souris présentant une hypercholestérolémie, mais le $\dot{V}O_{2max}$ reste significativement différent de celui mesuré chez les souris contrôles, saines (Niebauer et al. 1999). La synthèse du NO et la fonction vasculaire sont corrélées avec le niveau d'aptitude aérobie de ces souris (Niebauer et al. 1999). Chez l'homme, un entraînement de 6 mois augmente le débit sanguin en réponse à l'acétylcholine (ACh) de 203 %, et exacerbe l'action d'un inhibiteur de la NOS de 174% chez des patients ayant une insuffisance cardiaque chronique (Hambrecht et al. 1998). Le $\dot{V}O_{2max}$ est augmenté de 26 % dans le groupe de patients entraînés (Hambrecht et al. 1998). Cette amélioration du $\dot{V}O_{2max}$ est significativement corrélée (r = 0,64) avec les changements du débit sanguin dépendant du NO, après le programme d'entraînement (Hambrecht et al. 1998). Ces résultats semblent confirmer que l'altération de la dilatation dépendante du NO induit une réduction de la redistribution du débit sanguin aux muscles squelettiques au cours de l'exercice, pouvant ainsi faire de l'apport en O_2, un facteur limitant du $\dot{V}O_{2max}$. Au vu des points précédemment abordés, l'ADMA pourrait être la molécule régulant la biodisponibilité du NO, et par conséquent la redistribution du débit sanguin et l'apport en O_2 aux muscles actifs. Chez des sujets présentant un risque cardiovasculaire élevé ou une coronaropathie, l'entraînement en endurance de 12 semaines augmente leur aptitude aérobie, et diminue leur niveau sérique d'ADMA (Richter et al. 2005). Cette réduction de la concentration sérique ADMA est corrélée

avec une augmentation du niveau plasmatique de cGMP, reflétant une biodisponibilité du NO accrue (Richter et al. 2005).

Quelques études se sont intéressées au lien entre l'ADMA et l'aptitude aérobie dans des populations présentant une élévation des niveaux sanguins d'ADMA (Wilson et al. 2010; Deftereos et al. 2014; Tanahashi et al. 2014b; Reinecke et al. 2014). Les femmes présentent une augmentation des niveaux plasmatiques d'ADMA après le début de la ménopause, avec une concentration plasmatique d'ADMA supérieure chez celles âgées de plus de 50 ans par rapport aux hommes âgés du même âge (Schulze et al. 2005). Tanahashi et al. (2014b) montrent une association entre l'aptitude aérobie, exprimée à travers le $\dot{V}O_2$ au premier seuil ventilatoire ($\dot{V}O_{2ST}$), et la concentration plasmatique d'ADMA chez des femmes ménopausées. Cette association est confirmée lorsque la population est séparée selon la médiane de la distribution du $\dot{V}O_{2ST}$, les femmes ménopausées du groupe ayant l'aptitude aérobie la plus élevée ont une concentration plasmatique d'ADMA significativement inférieure à celle mesurée chez les femmes composant le groupe ayant l'aptitude aérobie la plus faible (Tanahashi et al. 2014b).

En outre, l'ADMA est un facteur de risque indépendant dans le développement de pathologies coronariennes (Schulze et al. 2006). Chez des sujets présentant des risques de coronaropathie, la concentration plasmatique d'ADMA est associée à l'aptitude aérobie, lorsqu'elle est estimée, à la fois, à travers le temps d'exercice atteint à l'épuisement, et l'intensité maximale convertie en équivalents métaboliques au cours de l'épreuve d'effort maximal (Deftereos et al. 2014). À la suite d'une analyse multivariée, dans cette même population, l'ADMA apparait comme un facteur prédictif indépendant de l'intensité maximale atteinte, exprimée en équivalents métaboliques, après l'ajustement avec les facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels (Deftereos et al. 2014). Ainsi, l'association entre l'ADMA et l'aptitude aérobie dans des populations présentant une augmentation des risques cardiovasculaires pourrait être liée à une altération de la vasodilatation dépendante du NO. Cette hypothèse semble être supportée par une étude portant sur des sujets atteints de polykystose rénale autosomique dominante (PKD), une maladie rénale génétique qui contribue à une dysfonction endothéliale précoce (Reinecke et al. 2014). Cette population est caractérisée par une élévation de la concentration plasmatique d'ADMA par rapport aux sujets sains, celle-ci survient précocement dans le développement de la pathologie (Wang et al. 2008). Reinecke et al. (2014) rapportent que les sujets atteints de PKD ont une aptitude aérobie, estimée par le

$\dot{V}O_{2max}$ et le $\dot{V}O_{2ST}$, réduite comparativement aux sujets sains appariés, malgré un niveau d'activité physique similaire sur les 12 derniers mois. L'ADMA et la production du NO, mesurées après l'exercice, ne diffèrent pas chez les sujets atteints de PKD par rapport aux valeurs relevées au repos, avant l'exercice ; alors que les sujets sains montrent, respectivement, une augmentation de la production du NO et une diminution du niveau plasmatique d'ADMA à la suite de l'exercice (Reinecke et al. 2014). Chez les sujets sains servant de contrôle, une corrélation négative est observée entre les niveaux d'ADMA et de NO mesurés après l'exercice (Reinecke et al. 2014). Donc, l'ADMA pourrait contribuer à moduler la biodisponibilité du NO, et altérer le tonus vasculaire ainsi que la régulation de la perfusion musculaire. Par ailleurs, l'ADMA est corrélée avec la sévérité de l'artériopathie des membres inférieurs, et apparait comme un prédicteur, indépendant des autres facteurs de risque, dans la survenue d'événements cardiovasculaires majeurs (Wilson et al. 2010). Cette pathologie se caractérise par un déséquilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2, en raison d'une perfusion périphérique altérée (Haas et al. 2012). L'ADMA est inversement corrélée à la tolérance à l'effort au cours d'un test de marche maximal sur tapis roulant, et ce indépendamment des autres facteurs de risques vasculaires (Wilson et al. 2010). De ce fait, l'élévation plasmatique de l'ADMA, à des niveaux observés chez des populations pathologiques, pourrait réduire l'apport en O_2 aux muscles squelettiques au cours de l'exercice, en altérant la vasodilatation périphérique dépendante de la biodisponibilité du NO, et participer ainsi à la limitation de l'aptitude aérobie.

4.2.3 ADMA et exercice dans des populations sans pathologies chroniques

Peu d'études se sont intéressées à l'ADMA dans le contexte de l'exercice chez des sujets ne présentant pas de pathologies cardiovasculaires ou de risques cardiovasculaires. La vasodilatation induite après un exercice d'intensité modérée a été proposée comme une variable pouvant détecter une dysfonction endothéliale précoce chez des sujets sains, apparemment indemnes d'altérations vasculaires (Wethal et al. 2015). Un pic de dilatation réactive réduit, au niveau de l'avant-bras, avant l'exercice, est associé à une augmentation plus importante de ce pic de dilatation réactive, lorsque la mesure est répétée après l'effort (Wethal et al. 2015). La concentration plasmatique d'ADMA est associée au pourcentage d'augmentation du pic de dilatation réactive post-exercice (Wethal et al. 2015).

En conclusion, la littérature scientifique semble étayer que l'ADMA et l'aptitude aérobie pourraient être en mesure de moduler la réponse vasodilatatrice dépendante du NO à l'exercice chez des sujets sains. Mais, aucune étude n'a établi si l'aptitude aérobie et la perfusion musculaire sont liées à l'ADMA chez des sujets sains. Si une telle association était trouvée, l'ADMA apparaitrait comme un facteur indépendant de la régulation du débit sanguin et de l'apport en O_2 aux muscles au cours de l'exercice, permettant ainsi de soutenir un haut niveau d'aptitude aérobie.

OBJECTIFS

1. **ETUDE 1 :** Effet de la supplémentation en nitrate sur la consommation d'oxygène au repos et au cours de l'exercice chez l'homme : revue systématique et méta-analyse

Dans une première étude, sous la forme d'une revue systématique et d'une méta-analyse, nous nous sommes penchés sur les effets de la supplémentation en NO_3^- sur le métabolisme oxydatif reflété par la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$), au cours de l'exercice, et au repos, chez des populations saines et atteintes de pathologies chroniques. L'intérêt de la présente étude, dans la perspective de la thèse, était de déterminer si l'amélioration de la tolérance à l'exercice, rapportée après une supplémentation en NO_3^- (versus placebo), était principalement expliquée par une réduction du coût en O_2 de la contraction musculaire. En effet, une faible disponibilité en O_2 limite la capacité à répondre à la demande métabolique des muscles actifs lors de l'exercice (Amann 2012; Poole et al. 2012). La disponibilité en O_2 aux seins des muscles actifs est déterminée par la pression en O_2, laquelle est sous l'influence de l'équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 au niveau tissulaire (Poole et al. 2012). Ces deux facteurs peuvent être notablement altérés dans certaines pathologies cardiovasculaires telles que l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs ou l'insuffisance cardiaque (Kenjale et al. 2011; Zamani et al. 2015). *Ainsi, cette étude nous permettait indirectement de conforter ou d'infirmer la proposition précédemment établie* (Maxwell et al. 1998)*, selon laquelle la redistribution du débit sanguin aux muscles actifs peut être un facteur limitant de l'apport en O_2, puis de la tolérance à l'exercice.*

2. **ETUDE 2 :** La supplémentation en nitrate d'origine alimentaire n'améliore pas la tolérance à l'effort au cours d'un exercice intermittent supramaximal chez des athlètes entraînés en endurance

Dans une seconde étude, nous avons étudié l'effet d'une supplémentation en NO_3^- d'origine alimentaire sur la tolérance à l'exercice, au cours d'un exercice intermittent d'intensité supramaximale, chez des sujets entraînés en endurance. Nous avons précédemment rapporté que, chez des sujets avec une aptitude aérobie modérée, la supplémentation en NO_3^- améliorait la tolérance à l'exercice, avec un renforcement du volume sanguin au niveau du vaste latéral lors de l'exercice, mais sans altération du coût en O_2 (Aucouturier et al. 2015). Toutefois, la supplémentation en NO_3^- s'est avérée n'avoir aucun effet ergogénique chez des sujets entraînés en endurance, caractérisés par une aptitude aérobie élevée (Hoon et al. 2013; Porcelli et al. 2015; Carriker et al. 2016). L'exercice intermittent à une intensité supramaximale nous offre des conditions appropriées pour investiguer la faculté de la supplémentation en NO_3^- à augmenter la biodisponibilité du NO. Cette modalité d'exercice d'une part, requiert un recrutement accru de fibres musculaires de type 2, dans lesquelles la perfusion microvasculaire est fortement sensible aux changements de biodisponibilité en NO (Ferguson et al. 2013a, b); et d'autre part, entraîne un déséquilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2, induisant une diminution de la pression O_2 et du pH au niveau intramusculaire (Krustrup et al. 2004; McDonough et al. 2005). La réduction du NO_2^- en NO est renforcée par la désoxyhémoglobine et la désoxymyoglobine sous pression en O_2 réduite et pH faible (Cosby et al. 2003; Shiva et al. 2007), des conditions présentes dans les muscles actifs lors de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale. Cependant, chez des sujets avec un $\dot{V}O_{2max}$ élevé, l'augmentation de la concentration plasmatique de NO_2^- est faible suite à une supplémentation en NO_3^- (Porcelli et al. 2015), et le niveau plasmatique basal de NO_2^- est par ailleurs corrélé avec l'aptitude aérobie (Totzeck et al. 2012). Ces résultats suggèrent que de la biodisponibilité du NO est partiellement affectée par le niveau d'aptitude aérobie. *Ainsi, cette étude nous permettait de déterminer si l'aptitude aérobie est en mesure de moduler la biodisponibilité du NO, à la suite d'une supplémentation en NO_3^- ; et d'explorer également si l'aptitude aérobie affecte les effets de la supplémentation en NO_3^- sur la perfusion musculaire et la tolérance à l'exercice.*

À l'opposé, dans les deux études suivantes, nous nous sommes intéressés à l'ADMA en tant que facteurs pouvant réduire la biodisponibilité du NO. Le rôle d'inhibiteur fonctionnel de l'ADMA a été confirmé précédemment chez l'Homme. Une augmentation pharmacologique des concentrations plasmatiques d'ADMA chez des sujets sains à des niveaux observés dans des pathologies cardiovasculaires, induit une élévation de la résistance vasculaire périphérique et une altération du débit cardiaque en réponse à l'exercice (Achan et al. 2003).

3. **ETUDE 3 :** Les concentrations plasmatiques de diméthylarginine asymétrique ne sont pas associées à l'aptitude aérobie chez des sujets jeunes et sains

Dans une troisième étude, nous avons étudié l'effet de l'aptitude aérobie sur la concentration plasmatique d'ADMA, et son association avec la fonction microvasculaire estimée à l'aide de la spectroscopie du proche infrarouge, au cours d'une épreuve d'effort maximal. Une augmentation de la concentration plasmatique d'ADMA est associée à une altération de l'aptitude aérobie dans diverses pathologies cardiovasculaires, telles que l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Wilson et al. 2010) ou l'insuffisance cardiaque (Seljeflot et al. 2011). Par ailleurs, une diminution de la concentration plasmatique d'ADMA a été observée après réentraînement chez des sujets présentant des risques d'événements cardiovasculaires (Hanssen et al. 2011; Turiel et al. 2011; Tanahashi et al. 2014a). Ainsi l'ADMA pourrait être utilisée comme marqueur d'altération de la fonction microvasculaire. Une réduction des concentrations plasmatiques d'ADMA pourrait par la même occasion améliorer la vasodilatation dépendante du NO, laquelle peut contribuer à augmenter l'aptitude aérobie à l'issue de l'entraînement. *Ainsi, cette étude nous permettait d'établir si l'ADMA peut être un facteur déterminant de l'apport en O_2, via un renforcement de la perfusion musculaire, aux muscles squelettiques lors de l'exercice ; et de déterminer si l'ADMA est associée à l'aptitude aérobie, chez des sujets jeunes, indemnes de pathologies chroniques.*

4. **ETUDE 4 :** La diméthylarginine asymétrique n'affecte pas le débit sanguin musculaire lors de l'exercice chez le rat

Dans une quatrième étude, nous avons investigué l'effet de l'ADMA, comme inhibiteur fonctionnel des NOS, sur la perfusion et la captation musculaires du glucose à l'exercice chez le rat. Une augmentation de la concentration plasmatique d'ADMA est associée à une faible vasodilatation dépendante du NO chez des sujets présentant ou non des risques cardiovasculaires (Böger et al. 1998; Ardigo et al. 2007). Le niveau plasmatique d'ADMA est aussi élevé chez des sujets ayant des désordres métaboliques comparativement aux sujets sains (Palomo et al. 2011; Sciacqua et al. 2012). En outre, la fonction microvasculaire dépendante du NO a été présentée comme un élément majeur dans le profil métabolique des sujets avec un diabète de type 2 (Bakker et al. 2009). La dysfonction microvasculaire semble être précoce puisque l'altération de la perfusion musculaire à l'exercice chez des sujets avec un diabète de type 2 est observée, sans différence significative du débit sanguin au niveau de l'artère brachiale par rapport aux sujets sains (Womack et al. 2009). *Ainsi, cette étude nous permettait de déterminer si une élévation du niveau d'ADMA à l'exercice réduit la distribution du débit sanguin aux muscles actifs ; et d'établir si une diminution de la perfusion musculaire dépendante du NO induit une réduction de la captation musculaire du glucose à l'exercice.*

ETUDE 1 :

Effet de la supplémentation en nitrate sur la consommation d'oxygène au repos et au cours de l'exercice chez l'homme : une revue systématique et une méta-analyse

1. Introduction

Comme abordé précédemment, une disponibilité réduite en O_2 limite la capacité à maintenir l'activité métabolique dans des conditions, telles que les pathologies cardiovasculaires, l'environnement hypoxique, ou chez les athlètes lorsque leur capacité maximale de transport de l'O_2 est atteinte lors d'exercices d'intensité élevée (Maltais et al. 1996; Amann 2012; Poole et al. 2012). L'activité métabolique est mesurée le plus souvent par l'intermédiaire de la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$), et représente la quantité d'énergie utilisée par l'organisme. Le $\dot{V}O_2$ est estimé généralement par la calorimétrie indirecte, et reflète le métabolisme oxydatif de l'ensemble de l'organisme (Even et Nadkarni 2012). Sous condition de repos, l'activité métabolique est déterminée par la dépense énergétique nécessaire au maintien des fonctions vitales de l'organisme (Weibel et Hoppeler 2005). La dépense énergétique est principalement liée à l'activité du cerveau, du foie, du cœur et des reins au repos, alors que les muscles squelettiques ne participent qu'à 20 à 30 % de cette dépense chez l'homme (Hsu et al. 2003). Au cours de l'exercice d'intensité maximale, l'activité métabolique peut augmenter jusqu'à 20 fois dans les muscles actifs chez les athlètes (Weibel et Hoppeler 2005). Il existe peu de possibilités de réduire la dépense énergétique au repos ou la demande métabolique pour une intensité d'exercice donnée (Larsen et al. 2007). Toutefois, Larsen et al. (2007) montrent, pour la première fois, une réduction du $\dot{V}O_2$ à l'exercice d'intensités comprises entre 45 et 80 % du $\dot{V}O_{2max}$ chez des sujets jeunes et sains après l'ingestion de sels de nitrate ($NaNO_3$). En outre, au repos, une diminution du $\dot{V}O_2$ est observée chez des sujets sains à la suite d'une supplémentation en NO_3^- de 3 jours (Larsen et al. 2014). Cet effet est semblable à celui de la restriction calorique et de la supplémentation en resvératrol (anti-oxydant), qui, tous deux, améliorent le profil métabolique et prolongent l'espérance de vie par une réduction du métabolisme de base (Fontana et al. 2010; Timmers et al. 2011). Une diminution du coût en O_2 peut s'avérer intéressante dans le cadre de pathologies chroniques, dans lesquelles l'équilibre entre l'utilisation et l'apport de l'O_2 est fortement altéré (Poole et al. 2012; Haas et al. 2012).

L'objectif premier de cette revue systématique et méta-analyse était de déterminer si la supplémentation en NO_3^- réduit le $\dot{V}O_2$ au repos et/ou à l'exercice. L'objectif secondaire était de déterminer les facteurs pouvant affecter les effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$, comme les caractéristiques de la population, la durée et la dose du traitement.

2. Méthodes

La revue systématique et la méta-analyse ont été réalisées selon les recommandations établies par le manuel Cochrane pour les revues systématiques portant sur des interventions, et rédigées selon les recommandations de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (Liberati et al. 2009).

2.1. Type d'études incluses

Les essais cliniques randomisés étudiant les effets de la supplémentation en NO_3^-, sous la forme de sels de nitrate et de jus de betterave rouge sur le $\dot{V}O_2$ chez l'homme, ont été inclus dans la revue systématique et la méta-analyse. Dans chaque étude, les paramètres suivants étaient relevés : la condition de l'expérimentation (exercice et/ou repos), la durée et la dose de la supplémentation, l'adhésion au protocole, le taux d'abandon, la durée de la période séparant les deux traitements, les effets indésirables. Les caractéristiques des sujets de chaque étude ont également été relevées comme suit : âge, sexe, état de santé *(sain, bronchopneumopathie chronique obstructive, insuffisance cardiaque, artériopathie oblitérante des membres inférieurs),* anthropométrie, activité physique ou niveau d'entraînement et $\dot{V}O_{2max}$.

2.2. Type d'interventions prises en compte

Les études incluses utilisaient la betterave rouge, riche en NO_3^-, ou des sels de NO_3^- ($NaNO_3$ ou KNO_3) dissouts dans l'eau, afin d'augmenter l'apport exogène de NO_3^-. Les caractéristiques des supplémentations utilisées, comme la durée, la dose et le type de traitement, ont été intégrées comme sources potentielles d'hétérogénéité dans les modèles de la méta-analyse. Concernant les études effectuées à l'exercice, le domaine d'intensité de l'exercice a été relevé afin de déterminer si les effets de la supplémentation en NO_3^- pouvaient être affectés par l'intensité de l'exercice. Les exercices, dont l'intensité était modérée, élevée et difficile, ont également été intégrés dans le même modèle pour analyser les $\dot{V}O_2$ obtenus lors des exercices sous-maximaux. Les $\dot{V}O_{2max}$ mesurés au cours d'épreuves d'effort maximal ont été incluses dans un modèle spécifique lors de l'analyse. Les critères choisis pour déterminer le domaine d'intensité de l'exercice sont présentés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1. Critères utilisés pour déterminer le domaine d'intensité de l'exercice

Intensité de l'exercice	**Délimitations physiologiques**	**Equivalent en % $\dot{V}O_{2max}$ ou puissance maximale aérobie**
Modérée	En dessous du premier seuil ventilatoire	< 60%
Elevée	Entre le premier seuil ventilatoire et la puissance critique	De 60 à 80%
Difficile	Au-dessus de la puissance critique	> 80 %
Maximal	Exercice réalisé jusqu'à l'épuisement volontaire du sujet avec l'atteinte du $\dot{V}O_{2max}$	

La puissance critique est définie comme l'intensité au-dessus de laquelle le $\dot{V}O_{2max}$ est atteint et maintenu jusqu'à l'épuisement du sujet.

Les résultats à la suite de supplémentation en jus de betterave rouge ou de sels de NO_3^- ont été inclus dans le même modèle pour évaluer la taille de l'effet de la supplémentation en NO_3^-, indépendamment de la forme du traitement. Cependant, la supplémentation en jus de betterave rouge est riche en anti-oxydants et en polyphénols, lesquels affectent le métabolisme du NO, et réduisent le stress nitrique (Lundberg et al. 2008). Ainsi, les supplémentations en jus de betterave rouge et en sels de NO_3^- ont été séparées dans une analyse en sous-groupes pour évaluer des différences potentielles dans les effets du NO_3^- selon la forme du traitement.

2.3. Type de mesures extraites

La première mesure relevée pour la méta-analyse était les changements de $\dot{V}O_2$ en absolu ou en relatif ($mL.min^{-1}$, $L.min^{-1}$, $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) au repos et à l'exercice en réponse à la supplémentation en NO_3^-. La seconde mesure relevée était les changements de concentrations plasmatiques de NO_3^- et de NO_2^-, après la supplémentation en NO_3^-, par rapport au placebo.

2.4. Stratégies de recherche

Les études ont été identifiées par une recherche dans les centres de données électroniques, PubMed, Scopus et Web of Science, mais aussi par la lecture des listes de références comprises dans les articles sélectionnés. La revue systématique était limitée aux articles publiés en Anglais, et aucune limite concernant les dates de publication des articles n'était fixée. La recherche a été conduite de février 2015 à Mars 2015. Les termes suivants ont été utilisés dans les centres de données électroniques : « dietary », « exogenous », « infusion », « inorganic », « nitrate », « nitrite », « beetroot », « beet root », « oxygen uptake » or « consumption », « metaoblic rate » et « energy expenditure ».

2.5. Sélection des études et extraction des données

La lecture des titres, des résumés et des articles a été effectuée séparément par deux personnes différentes. La première étape de sélection consistait à l'analyse des titres et des résumés. La seconde étape comprenait la lecture des articles sélectionnés à l'issue de la première phase, et la recherche d'articles complémentaires pouvant répondre aux critères d'inclusion dans les listes de références des articles choisis. Tout doute sur l'éligibilité d'un article était résolu par consensus.

Les données étaient extraites à l'aide d'une feuille de collecte. L'un des lecteurs était en charge d'extraire les données, tandis que l'autre vérifiait la validité des données collectées. En cas de données manquantes, les auteurs déclarés, comme correspondant dans les articles, étaient contactés par message électronique.

2.6 Analyse des données

L'analyse complète a été réalisée à l'aide du logiciel, Review Manager (Review Manager (RevMan) [Windows 7, Microsoft]. Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014.). La taille de l'effet pour le $\dot{V}O_2$ au repos et à l'exercice était estimée à travers des modèles aléatoires de DerSimonian et Laird. Les données du $\dot{V}O_2$ sont présentées comme des différences moyennes standardisées avec un intervalle de confiance fixé à 95 %. Le seuil de significativité était fixé à $p \leq 0,05$. L'hétérogénéité entre les études était calculée avec le test Q de Cochrane ($p < 0,10$) et la valeur de I^2 (faible ≥ 25 %, modéré ≥ 50 %, élevé ≥ 75 %). La variance entre les études était calculée à partir de Tau^2 ($\tau^2 > 1$). Une analyse de sous-groupes a été réalisée pour évaluer les effets des facteurs suivants sur les modèles : la forme de la supplémentation *(betterave rouge ou sels de $NaNO_3$)*, la condition expérimentale *(normoxie ou hypoxie)*, la dose et la durée de la supplémentation, la concentration plasmatique de NO_3^- et NO_2^-, et l'état de santé *(sain ou pathologie)*. La médiane de chaque variable incluse dans l'analyse de sous-groupes était utilisée comme point de démarcation pour former 2 sous-groupes : dose NO_3^- (élevée > 7.5 mmol versus faible ≤ 7.5 mmol), durée de la supplémentation (courte ≤ 3 jours versus longue > 3 jours), et changement de la concentration plasmatique de NO_2^- et NO_3^- (NO_3^- élevé > + 574 % versus NO_3^- faible ≤ + 574 % ; NO_2^- élevé > 115,5 % versus NO_2^- faible ≤ 115,5 %). Une analyse de sensibilité a été réalisée pour déterminer l'influence des études, avec les effets les plus larges, sur l'ensemble des modèles les intégrant. L'évaluation des risques de biais était effectuée à l'aide de l'outil Cochrane traitant du risque de biais, et le biais de publication était estimé à partir de l'analyse d'un graphe en entonnoir.

3. Résultats

3.1 Etudes sélectionnées

À partir des termes entrés dans les bases de données électroniques, 3314 articles ont été identifiés, parmi lesquels 57 articles ont été jugés comme potentiellement éligibles pour l'inclusion dans la revue, après lecture du titre et du résumé. À la suite de la lecture des articles, 29 études ont été sélectionnées pour intégrer la revue systématique contre 26 articles pour la méta-analyse, permettant de réaliser une analyse quantitative. Les études exclues de la méta-analyse l'ont été pour les raisons suivantes : données indisponibles après la sollicitation des auteurs, une différence entre l'intensité d'exercices réalisés sous supplémentation en NO_3^- et le placebo, l'absence d'évaluation des changements de concentrations plasmatiques de NO_3^- et de NO_2^-. La figure 4 présente la procédure de recherche employée pour la revue systématique et la méta-analyse.

3.2 Caractéristiques des études incluses

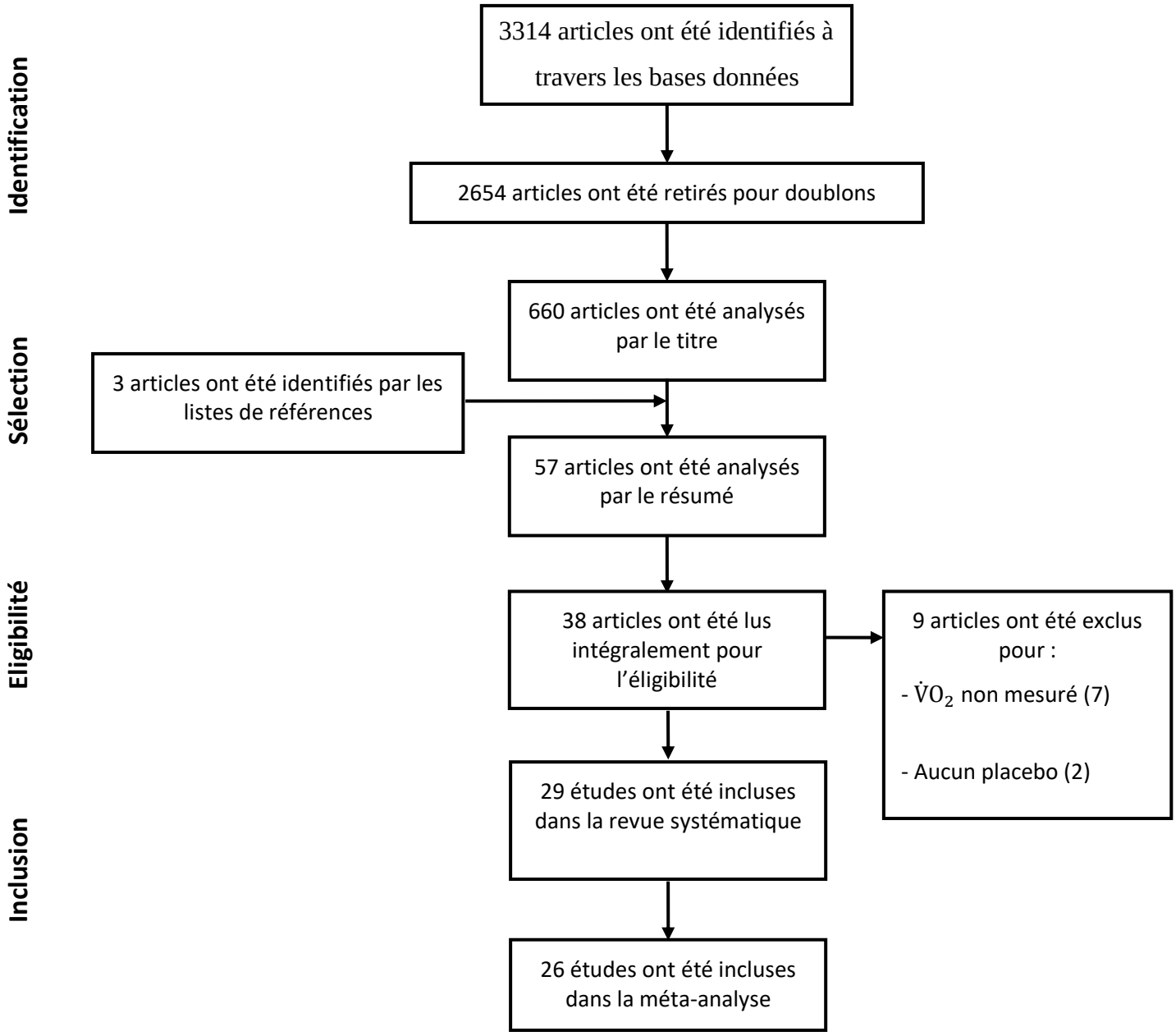
Les études étaient des essais cliniques randomisés, transversaux, organisés en double ou simple aveugle, et utilisaient une condition placebo comme contrôle. Les études ont été conduites entre 2007 et 2015. Les sujets jeunes et sains, modérément ou intensivement entraînés, ont fait l'objet de 23 études au total. Une seule étude a été réalisée chez des sujets âgés (63,5 ± 3,0 ans) (Kelly et al. 2013a). Une autre étude a été conduite chez des sujets sains, mais en situation de surpoids (Bond et al. 2014). Au total, 4 études se sont intéressées à des sujets présentant une pathologie chronique : 2 études chez des patients avec une bronchopneumopathie chronique obstructive (Berry et al. 2015; Shepherd et al. 2015), 1 étude chez des patients avec une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Kenjale et al. 2011), et 1 étude chez des patients ayant une insuffisance cardiaque avec une fraction d'éjection systolique préservée (Zamani et al. 2015). La méta-analyse a été ainsi conduite sur 264 participants avec 7 à 17 sujets inclus par étude.

L'ingestion de sels de NO_3^- ($NaNO_3$ ou KNO_3) et de jus de betterave rouge a été utilisée dans 6 et 23 études, respectivement, afin d'augmenter l'apport exogène de NO_3^-. Les placebos

utilisés comme contrôle étaient les suivants : du chlorure de sodium (NaCl) dans 5 études, une solution de maltodextrine dans 1 étude, du jus de betterave rouge appauvri en NO_3^- dans 12 études, du jus de pomme-cassis dans 4 études, du jus de cassis seul dans 3 études, du jus d'orange dans 2 études, du jus de prune dans 1 étude, et du jus de tomate dans 1 étude. Concernant le régime d'ingestion, une prise aigue de NO_3^- a été employée dans 13 études, tandis qu'une ingestion sur plusieurs jours a été utilisée dans 15 études. La durée de supplémentation en NO_3^- était comprise entre 3 et 15 jours avec une période de « sevrage » entre les conditions de 2 à 14 jours. Seule une étude parallèle a utilisé un régime de supplémentation en NO_3^- plus long, où les sujets ingéraient du jus de betterave rouge, ou le placebo, 4 jours avant les tests pré-entraînement, puis les supplémentations étaient poursuivies durant les 6 semaines, au cours desquelles les sujets prenaient part à un entraînement en endurance en condition hypoxique (Puype et al. 2015). Dans la plupart des études, l'ingestion du NO_3^- précédait de 2,5 à 3 h la mesure du $\dot{V}O_2$, qui correspond à la période s'écoulant avant le pic de NO_2^- dans le plasma à la suite d'une supplémentation de NO_3^- (Webb et al. 2008; Govoni et al. 2008). Une seule étude avait opté pour une ingestion de NO_3^- 1h avant la mesure du $\dot{V}O_2$ (Larsen et al. 2014). La quantité quotidienne de NO_3^- ingérée était comprise entre 5,1 et 19,5 mmol.

La prise alimentaire de NO_3^- en dehors de la supplémentation en NO_3^- a été contrôlée dans 12 études. Parmi ces dernières études, des recommandations nutritionnelles et des repas standardisés (diner et petit-déjeuner) ont également été appliqués dans 1 (Bescós et al. 2011) et 2 études (Masschelein et al. 2012; Puype et al. 2015), respectivement. Sur les 17 études n'appliquant pas de restriction alimentaire, les sujets étaient invités à reproduire leur alimentation entre les deux conditions (NO_3^- versus placebo) dans 10 études ; et des repas standardisés avant les tests expérimentaux à la suite des supplémentations étaient fournis aux sujets dans 4 études (Cermak et al. 2012; Peacock et al. 2012; Christensen et al. 2013; Wylie et al. 2013a). Les sujets avaient également pour instruction de ne pas consommer de café et d'alcool, 6 h et 24 h, respectivement, avant les visites expérimentales, ceci dans les études s'intéressant aux effets de la supplémentation en NO_3^- à l'exercice. De plus, les participants étaient invités à restreindre la pratique d'une activité physique intense dans les 24-48h précédant les tests expérimentaux sous supplémentations. Dans l'ensemble des études, l'utilisation de bains de bouche anti-bactériens était proscrite, puisque ceux-ci inhibent la conversion du NO_3^- en NO_2^- au niveau buccal (Govoni et al. 2008).

FIGURE 4. Procédure de sélection de la recherche dans la littérature scientifique



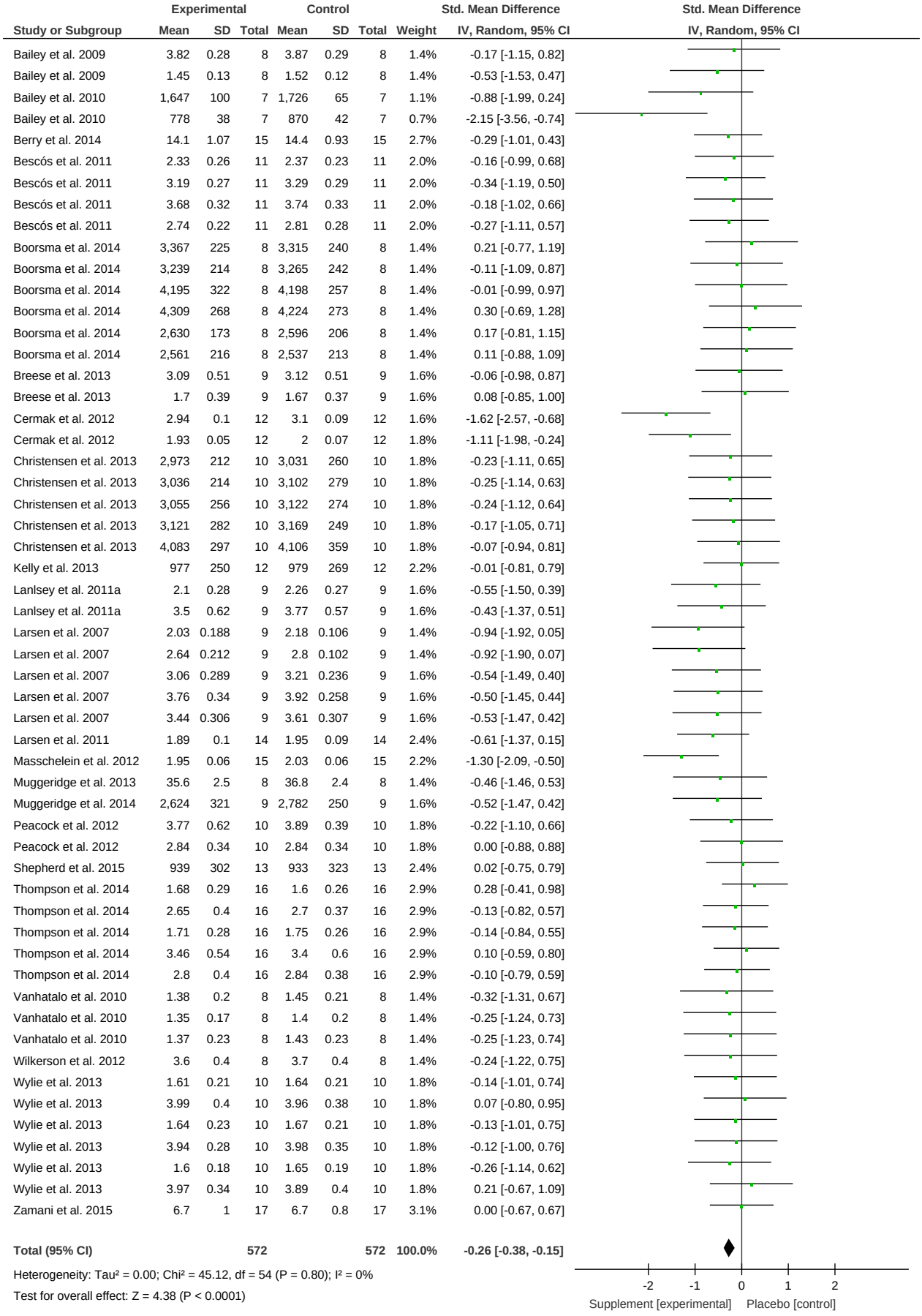
3.3 Risque de biais dans les études incluses

La grande majorité des études intégrées dans la revue systématique et la méta-analyse a été considérée comme présentant un faible risque de biais selon l'outil d'évaluation des risques de biais établi par Cochrane (Higgins et al. 2011). Un risque élevé de biais a été estimé dans 2 études, en raison de la connaissance éventuelle de la supplémentation ingérée lors des visites expérimentales, concernant les participants (simple aveugle) et les expérimentateurs (double aveugle). Toutefois, plusieurs études ont été identifiées comme présentant un risque de biais non précisément défini, pour les raisons suivantes : doute sur la randomisation dans 1 étude ; connaissance envisagée de la supplémentation ingérée lors des visites dans 9 études ; collecte et traitement des données sans masquer les conditions (NO_3^- versus placebo) auxquelles elles se réfèrent, ceci dans 3 études ; et des données incomplètement rapportées dans 3 études. Les interventions ont été généralement randomisées dans l'ensemble des études. Le taux d'abandon et la durée de la période séparant les deux traitements ont été rapportés dans toutes les études incluses. Les essais cliniques ont été annoncés comme conduits en double (16 études) et simple (9 études) aveugle, lorsque la condition placebo présentait un goût, une odeur ou une apparence différente de celle de la supplémentation en NO_3^-. Les participants n'ont pas été informés des hypothèses expérimentales dans 7 études, et l'objet des études était communiqué comme une comparaison des effets physiologiques de deux traitements issus de produits végétaux ou de solutions orales. Néanmoins, les auteurs de ces études précisent que les participants n'étaient pas informés des effets attendus de la supplémentation en NO_3^-. Dans 18 études, les auteurs n'indiquent pas si les participants avaient pris connaissance des propriétés de la supplémentation en NO_3^-, et des objectifs précis des études. L'objectif de tester les effets de la supplémentation en NO_3^- sur la performance à l'exercice a été communiqué aux sujets dans 2 études (Christensen et al. 2013; Berry et al. 2015). Parmi l'ensemble des essais intégrés, 18 études rapportent des sources de financement, et 8 études informent de potentiels conflits d'intérêt.

3.4 Résultats de la revue systématique

Les résultats des études ne sont pas rapportés individuellement dans cette partie par souci de lisibilité, et pour éviter toute redondance avec la partie contextualisation de cette thèse, qui reprend en grande partie les travaux étudiant les effets de la supplémentation en NO_3^- dans le cadre de l'exercice.

FIGURE 5. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité sous-maximale à la suite de la supplémentation en NO_3^-



3.5 Synthèse des résultats issus de la méta-analyse

3.5.1. Taille de l'effet dans les modèles généraux

La supplémentation en NO_3^- réduit le $\dot{V}O_2$ au cours d'exercices d'intensité sous-maximale [-0,26 (95% IC : - 0,38, - 0,15), p < 0,01] (Figure 5). Lorsque les données sont analysées selon le domaine d'intensité de l'exercice, la supplémentation en NO_3^- diminue le $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité modérée [-0,29 (95% IC : -0,48, -0,10), p < 0,01] (Figure 6) et élevée [-0,33 (95% IC : -0,54, -0,12), p < 0,01] (Figure 7). Cependant, aucun effet de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ n'est observé au repos [0,01 (95% IC : -0,47, 0,50), p = 0,96] (Figure 8), au cours de l'exercice d'intensité difficile [-0,14 (95% IC : -0,38, 0,09), p = 0,24] (Figure 9) et lors d'épreuve d'effort maximal [0,02 (95% IC : -0,42, 0,46), p = 0,93] (Figure 10).

FIGURE 6. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité modérée à la suite de la supplémentation en NO_3^-

	Experimental			Control				Std. Mean Difference
Study or Subgroup	Mean	SD	Total	Mean	SD	Total	Weight	IV, Random, 95% CI
Bailey et al. 2009	1.45	0.13	8	1.52	0.12	8	3.2%	-0.53 [-1.53, 0.47]
Bailey et al. 2010	778	38	7	870	42	7	1.7%	-2.15 [-3.56, -0.74]
Bescós et al. 2011	2.33	0.26	11	2.37	0.23	11	4.4%	-0.16 [-0.99, 0.68]
Bescós et al. 2011	2.74	0.22	11	2.81	0.28	11	4.4%	-0.27 [-1.11, 0.57]
Boorsma et al. 2014	2,561	216	8	2,537	213	8	3.4%	0.11 [-0.88, 1.09]
Boorsma et al. 2014	2,630	173	8	2,596	206	8	3.3%	0.17 [-0.81, 1.15]
Breese et al. 2013	1.7	0.39	9	1.67	0.37	9	3.7%	0.08 [-0.85, 1.00]
Cermak et al. 2012	1.93	0.05	12	2	0.07	12	4.1%	-1.11 [-1.98, -0.24]
Kelly et al. 2013	977	250	12	979	269	12	4.8%	-0.01 [-0.81, 0.79]
Lansley et al. 2011a	2.1	0.28	9	2.26	0.27	9	3.6%	-0.55 [-1.50, 0.39]
Larsen et al. 2007	2.03	0.188	9	2.18	0.106	9	3.3%	-0.94 [-1.92, 0.05]
Larsen et al. 2011	1.89	0.1	14	1.95	0.09	14	5.2%	-0.61 [-1.37, 0.15]
Masschelein et al. 2012	1.95	0.06	15	2.03	0.06	15	4.8%	-1.30 [-2.09, -0.50]
Peacock et al. 2012	2.84	0.34	10	2.84	0.34	10	4.1%	0.00 [-0.88, 0.88]
Shepherd et al. 2015	939	302	13	933	323	13	5.1%	0.02 [-0.75, 0.79]
Thompson et al. 2014	1.68	0.29	16	1.6	0.26	16	6.0%	0.28 [-0.41, 0.98]
Thompson et al. 2014	1.71	0.28	16	1.75	0.26	16	6.1%	-0.14 [-0.84, 0.55]
Vanhatalo et al. 2010	1.38	0.2	8	1.45	0.21	8	3.3%	-0.32 [-1.31, 0.67]
Vanhatalo et al. 2010	1.35	0.17	8	1.4	0.2	8	3.3%	-0.25 [-1.24, 0.73]
Vanhatalo et al. 2010	1.37	0.23	8	1.43	0.23	8	3.3%	-0.25 [-1.23, 0.74]
Wylie et al. 2013	1.64	0.23	10	1.67	0.21	10	4.1%	-0.13 [-1.01, 0.75]
Wylie et al. 2013	1.61	0.21	10	1.64	0.21	10	4.1%	-0.14 [-1.01, 0.74]
Wylie et al. 2013	1.6	0.18	10	1.65	0.19	10	4.1%	-0.26 [-1.14, 0.62]
Zamani et al. 2015	6.7	1	17	6.7	0.8	17	6.4%	0.00 [-0.67, 0.67]
Total (95% CI)			**259**			**259**	**100.0%**	**-0.29 [-0.48, -0.10]**

Heterogeneity: Tau² = 0.03; Chi² = 26.54, df = 23 (P = 0.28); I² = 13%

Test for overall effect: Z = 3.01 (P = 0.003)

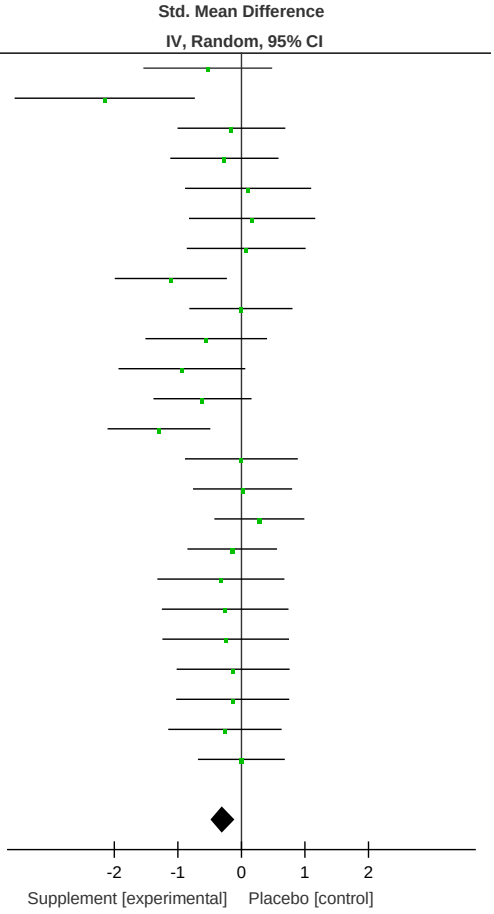


FIGURE 7. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité élevée à la suite de la supplémentation en NO_3^-

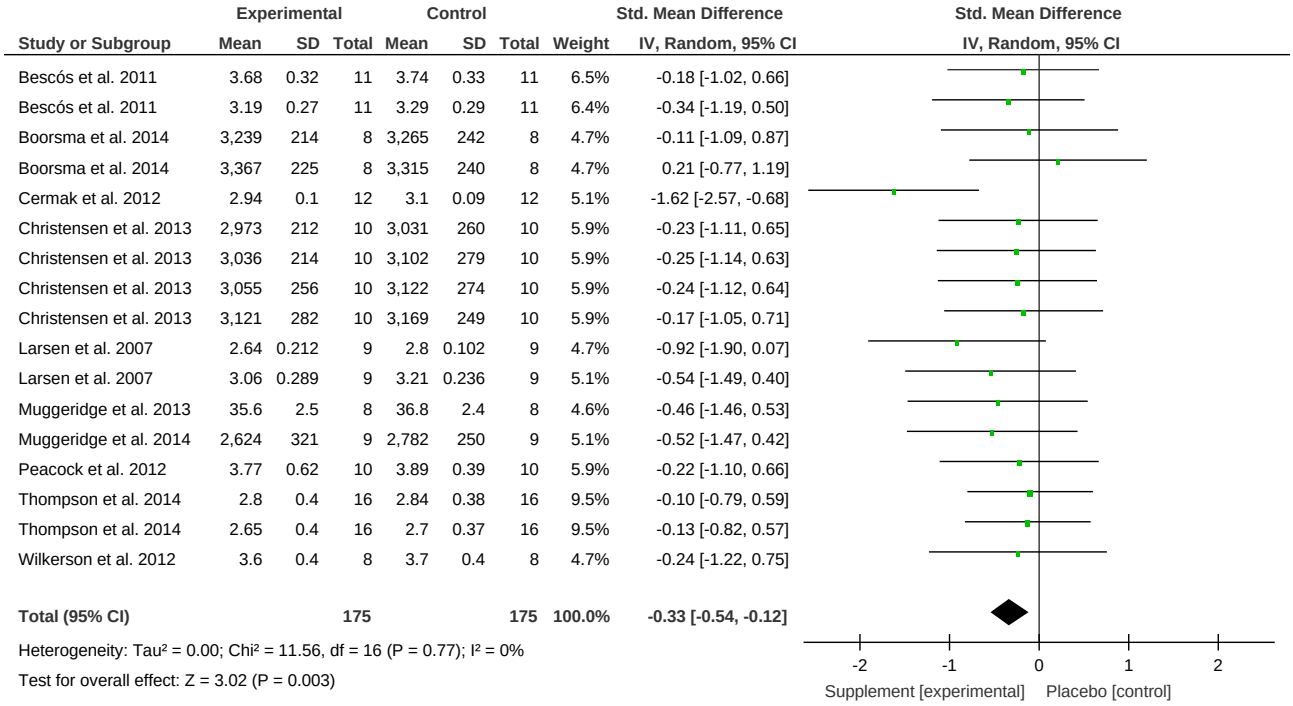


FIGURE 8. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité difficile à la suite de la supplémentation en NO_3^-

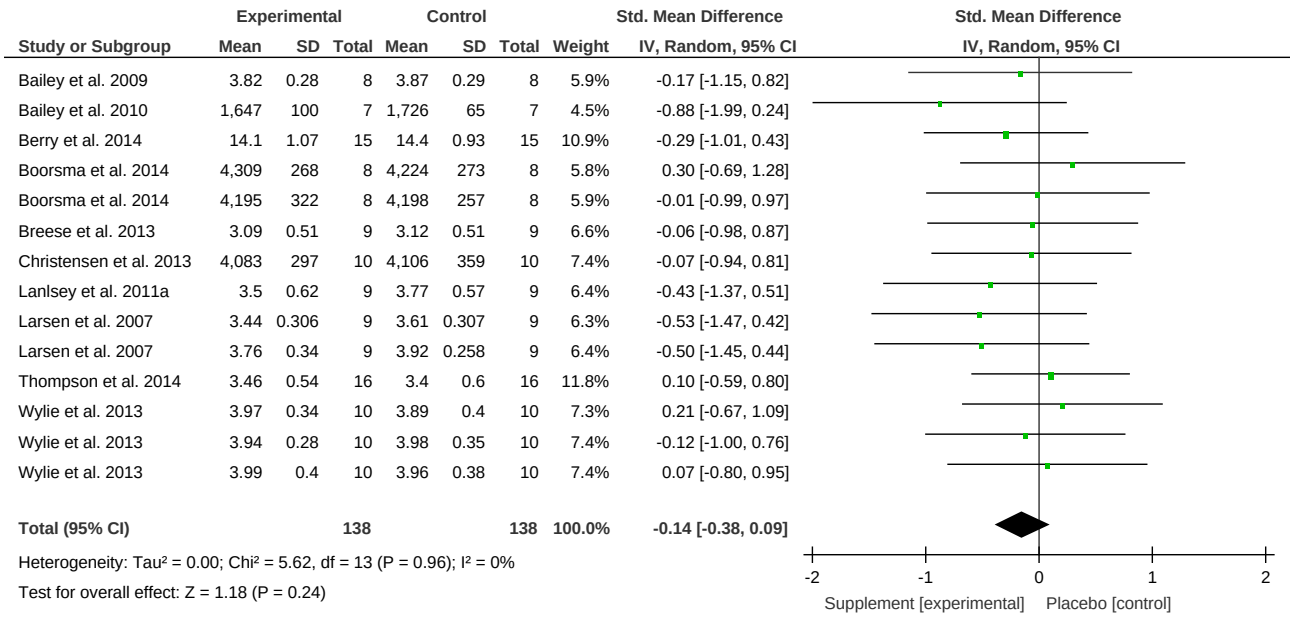


FIGURE 9. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité maximale à la suite de la supplémentation en NO_3^-

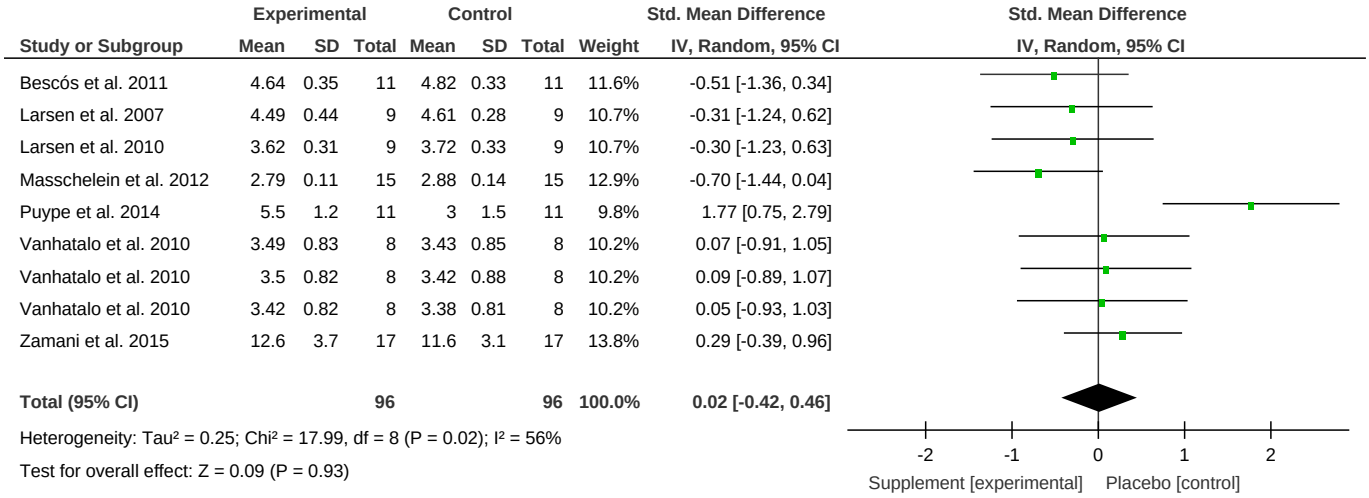
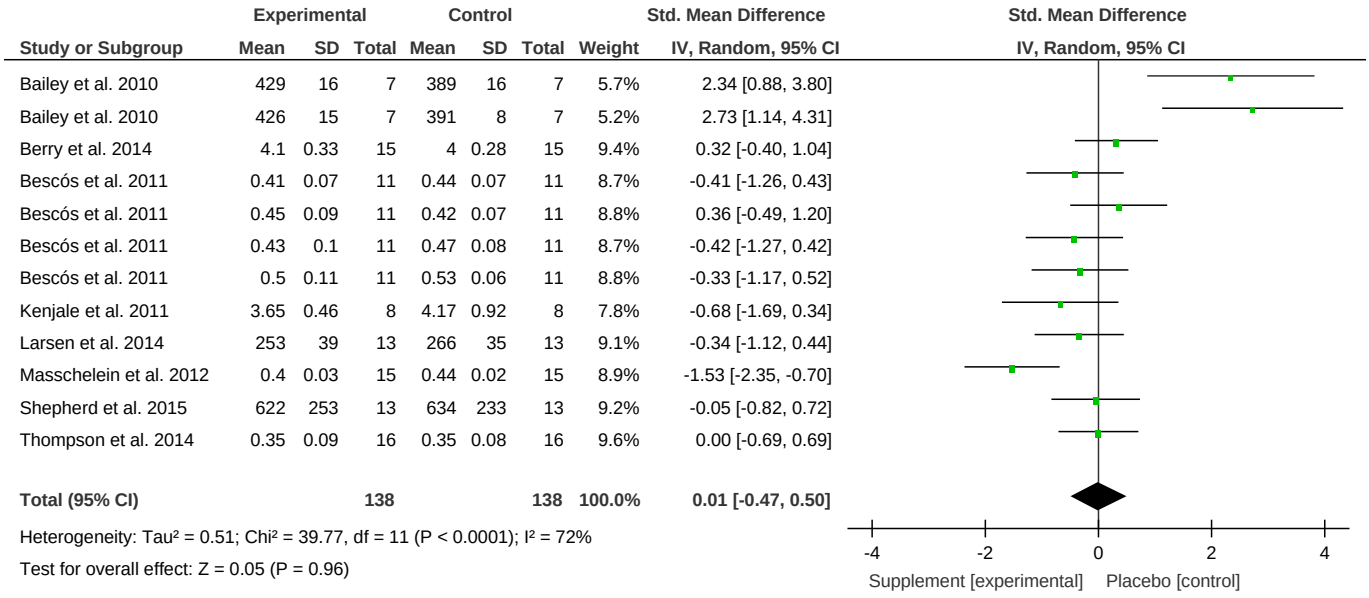


FIGURE 10. Taille de l'effet pour les changements de $\dot{V}O_2$ en condition de repos à la suite de la supplémentation en NO_3^-



3.5.2 Analyse en sous-groupes

Les paramètres choisis comme facteurs d'influence, à l'exception de l'état de santé, n'affectent pas les effets de la supplémentation en NO_3^- lors d'exercices sous-maximaux. En effet, le $\dot{V}O_2$ est réduit à la suite de la supplémentation en NO_3^- chez les sujets sains [-0,28 (95 % IC : -0,40, -0,16), p < 0,01], mais cet effet n'apparait pas chez les patients atteints de pathologies chroniques [-0,09 (95 % IC : -0,50, 0,32), p = 0,67].

Concernant la forme du traitement, l'analyse de sous-groupes ne montre pas de différence entre les effets des sels de NO_3^- et le jus de betterave rouge sur le $\dot{V}O_2$, avec une diminution significative du $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité modérée [betterave rouge : -0,27 (95 % IC : -0,50, -0,04), p = 0,02 ; sels de NO_3^- : -0,38 (95 % IC : -0,76, 0,00), p = 0,05] et élevée [betterave rouge: -0,30 (95 % IC: -0,55, -0,04), p = 0,02 ; sels de NO_3^- : -0,41 (95 % IC: -0,81, -0,01), p = 0,04].

Au regard des doses de NO_3^- ingérées par les sujets, une faible dose en NO_3^- a un effet sur le $\dot{V}O_2$ au cours d'exercices d'intensité modérée [-0,41 (95 % IC : -0,69, -0,12), p < 0,01], contrairement à une dose élevée en NO_3^- [-0,17 (95 % IC : -0,43, 0,09), p = 0,20]. Une dose élevée en NO_3^- diminue le $\dot{V}O_2$ lors de l'exercice d'intensité élevée [-0,53 (95 % IC : -1,06, -0,01), p = 0,05], alors qu'une faible dose en NO_3^- est associée avec une tendance vers une réduction du $\dot{V}O_2$, dans le même domaine d'intensité [-0,24 (95 % IC : -0,50, 0,02), p = 0,07].

La durée de la supplémentation en NO_3^- influence la présence des effets du NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$, avec une diminution du $\dot{V}O_2$ après une longue supplémentation (> 3 jours) en NO_3^-, au cours de l'exercice d'intensité modérée [-0,62 (95 % IC : -1,05, -0,19), p < 0,01]. Cet effet n'est pas observé pour les supplémentations en NO_3^- de courte durée dans ce même domaine d'intensité [-0,14 (95 % IC : -0,35, 0,07), p = 0,19]. En revanche, une courte supplémentation en NO_3^- (≤ 3 jours) est associée à une réduction du $\dot{V}O_2$ lors d'exercices d'intensité élevée [-0,30 (95 % IC : -0,57, -0,04), p = 0,02], ce qui n'est pas le cas pour les supplémentations en NO_3^- de longue durée [-0,38 (95 % IC : -0,87, 0,10), p = 0,12].

Concernant les exercices dans les domaines d'intensité difficile et maximale, aucun changement au niveau de l'effet de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ n'est trouvé, lorsque

l'analyse de sous-groupes est réalisée en fonction de la forme, la dose et la durée des traitements. Ces mêmes résultats sont également observés sous condition de repos.

La supplémentation en NO_3^- n'a pas d'effet sur le $\dot{V}O_2$ chez des patients avec une pathologie chronique [condition de repos : -0,04 (95 % IC : -0,57, 0,48), p = 0,87 ; exercice d'intensité modérée : 0,01 (95 % IC : -0,50, 0,51), p = 0,98]. Si les patients atteints de pathologies chroniques sont exclus des modèles, les sujets sains présentent une diminution du $\dot{V}O_2$ en réponse à la supplémentation en NO_3^- au cours de l'exercice d'intensité modérée [-0,33 (95 % IC : -0,54, -0,13), p < 0,01].

L'analyse de sous-groupes n'a pas été effectuée pour la condition hypoxique au vu du faible nombre d'études menées dans cette condition (Masschelein et al. 2012; Muggeridge et al. 2014; Puype et al. 2015). En outre, les différentes procédures analytiques pour mesurer les concentrations plasmatiques de NO_3^- et de NO_2^- conduisent à une large différence entre les valeurs rapportées dans les études, empêchant ainsi toute analyse de sous-groupes valide concernant la réponse plasmatique du NO_3^- et de NO_2^- à la suite des supplémentations.

3.5.3 Influence des études avec les effets les plus larges

Quand les études avec les effets les plus larges sur le $\dot{V}O_2$ sont exclues, une tendance vers une diminution du $\dot{V}O_2$ à la suite de la supplémentation en NO_3^- est observée en condition de repos [-0,28 (95 % IC : -0,62, 0,05), p = 0,10]. L'analyse de sensibilité ne montre pas de changement d'effet sur le $\dot{V}O_2$ lors d'exercices sous-maximaux [-0,23 (95 % IC : -0,35, -0,11), p < 0,01], lorsque les études avec les plus larges effets sont exclues. L'absence de changement au niveau des effets sur le $\dot{V}O_2$ est observée, quand l'analyse est effectuée dans les modèles basés sur les domaines d'intensité de l'exercice (*exercice d'intensité modérée* : [-0,26 (95 % IC : -0,43, -0,08), p < 0,01], *exercice d'intensité élevée* : [-0,26 (95 % IC : -0,48, -0,04), p = 0,02], et *exercice d'intensité difficile* : [-0,11 (95 % IC : -0,35, 0,14), p = 0,38]). L'exclusion des études avec les plus larges effets n'entraîne pas de changement des effets du NO_3^- sur le $\dot{V}O_{2max}$ mesuré au cours d'épreuves d'effort maximal [-0,17 (95 % IC : -0,47, 0,13), p = 0,27].

L'analyse de sous-groupes, qui évalue l'influence de facteurs sélectionnés, ne montre pas de changement d'effet de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensités modérée et difficile, lorsque les études avec les plus larges effets sont exclues. Quand l'analyse est limitée au jus de betterave rouge [-0,19 (95 % IC : -0,46, 0,07), p = 0,15] et une dose élevée en NO_3^- [-0,31 (95 % IC : -0,74, 0,11), p = 0,15], les effets sur le $\dot{V}O_2$ ne sont plus significatifs au cours de l'exercice d'intensité élevée. En revanche, lorsque l'analyse est limitée aux sujets sains, une tendance vers une réduction du $\dot{V}O_2$ apparait en condition de repos [-0,37 (95 % IC : -0,80, 0,05), p = 0,08] et à l'exercice dans le domaine d'intensité maximale [-0,29 (95 % IC : -0,63, 0,06), p = 0,10].

3.5.4 Biais de publication

L'analyse des graphes en entonnoir montre une symétrie globale de la distribution des effets individuels des études autour de la taille de l'effet de l'ensemble du modèle pour les exercices d'intensité modérée, élevée, difficile, suggérant une absence de biais de publication. Par contre, la distribution des effets individuels des études est asymétrique pour les modèles intégrant les $\dot{V}O_2$ mesurés en condition de repos et à l'exercice d'intensité maximale. Cette asymétrie de la distribution des effets pourrait être liée à une hétérogénéité significative dans ces modèles, comme présenté ci-dessous.

3.5.5 Hétérogénéité et incohérence des modèles

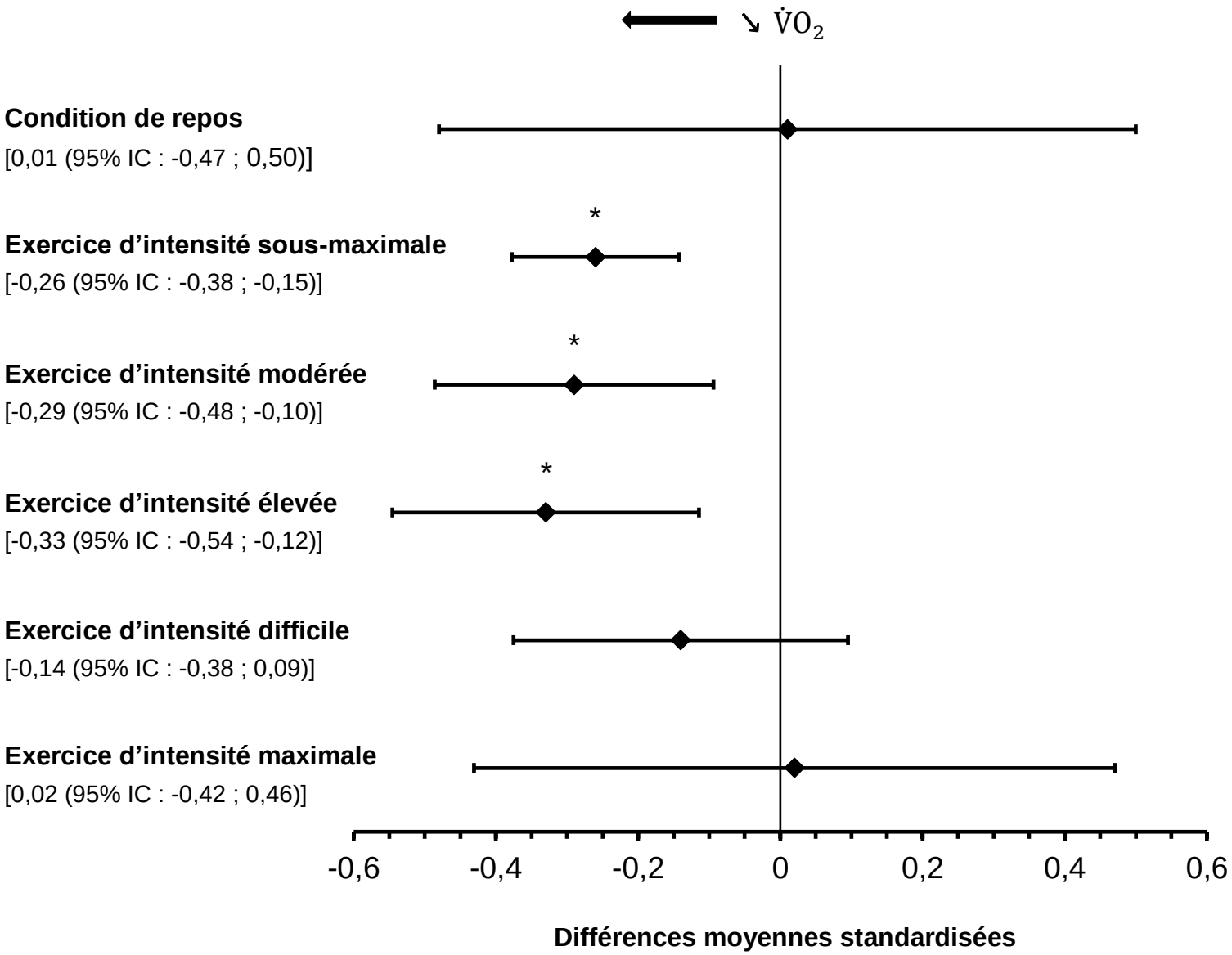
Aucune hétérogénéité ou incohérence significative n'est observée dans les modèles pour les exercices sous-maximaux [Q = 45,12 (p = 0,80), τ^2 = 0, I^2 = 0%]. Cependant, la supplémentation en NO_3^- de longue durée est significativement associée avec une hétérogénéité [Q = 28,37 (p = 0,10), τ^2 = 0,10] et une faible incohérence [I^2 = 30%], qui disparaissent dès lors que les études avec les plus larges effets sont exclues du modèle.

Une hétérogénéité significative est trouvée dans les modèles relatifs aux $\dot{V}O_2$ en condition de repos [Q = 39,77 (p < 0,01), τ^2 = 0,51] et à l'exercice maximal [Q = 17,99 (p = 0,02), τ^2 = 0,25], avec une incohérence élevée [I^2 = 72%] et modérée [I^2 = 56%], respectivement. En condition de repos, l'hétérogénéité pourrait être expliquée par la supplémentation en jus de betterave rouge [Q = 36,70 (p < 0,01), τ^2 =1,08], la faible dose en NO_3^- [Q = 36,86 (p < 0,01),

$\tau^2 = 0,91$], la supplémentation de longue durée [$Q = 34,24$ ($p < 0,01$), $\tau^2 = 6,74$], et la présence de sujets sains [$Q = 37,13$ ($p < 0,01$), $\tau^2 = 0,74$] ; ces facteurs sont associés à une incohérence élevée [I^2 = 84%, 81%, 94%, et 78%, respectivement]. Concernant les exercices dans le domaine d'intensité maximale, les facteurs pouvant expliquer l'hétérogénéité sont les suivants, la supplémentation en jus de betterave rouge [$Q = 15,03$ ($p = 0,01$), $\tau^2 = 0,40$], une faible dose en NO_3^- [$Q = 16,82$ ($p = 0,01$), $\tau^2 = 0,39$], une supplémentation de longue durée [$Q = 14,83$ ($p < 0,01$), $\tau^2 = 0,87$], et la présence de sujets sains [$Q = 17.09$ ($p = 0.02$), $\tau^2 = 0.31$] ; chacun de ces facteurs présente une incohérence de modérée à élevée [I^2 = 67%, 64%, 80% et 59%, respectivement].

L'exclusion des études avec les plus larges effets diminue notablement la présence d'hétérogénéité et d'incohérence dans les modèles relatifs à la condition de repos [$Q = 15,35$ ($p = 0,08$), $\tau^2 = 0,12$, $I^2 = 41\%$] et à l'exercice maximal [$Q = 5,13$ ($p = 0,64$), $\tau^2 = 0$, $I^2 = 0\%$]. En condition de repos, l'analyse de sensibilité montre une diminution de l'incohérence pour la supplémentation en betterave rouge [$I^2 = 69\%$], la faible dose en NO_3^- [$I^2 = 57\%$] et la présence de sujets sains [$I^2 = 48\%$]. Toutefois, l'hétérogénéité reste significative pour la supplémentation en jus de betterave rouge [$Q = 12,93$ ($p = 0,01$), $\tau^2 = 0,36$] et la faible dose en NO_3^- [$Q = 11,50$ ($p = 0,04$), $\tau^2 = 0,22$] dans ce même modèle. L'exclusion des études avec les plus larges effets modifie à la fois l'hétérogénéité et l'incohérence dans les modèles regroupant les $\dot{V}O_2$ mesurés à l'exercice maximal comme suit : supplémentation en jus de betterave rouge [$Q = 4,04$ ($p = 0,40$), $\tau^2 = 0$, $I^2 = 1\%$], faible dose en NO_3^- [$Q = 2.94$ ($p = 0.71$), $\tau^2 = 0$, $I^2 = 0\%$], supplémentation de longue durée [$Q = 2,18$ ($p = 0,34$), $\tau^2 = 0,02$, $I^2 = 8\%$], et sujets sains [$Q = 2,95$ ($p = 0,82$), $\tau^2 = 0$, $I^2 = 0\%$].

FIGURE 11. Résumé des effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$. * : $p < 0,05$.



4. Discussion

Dans notre étude 1, l'objectif principal était de déterminer si la supplémentation en NO_3^- réduit le $\dot{V}O_2$ au repos et/ou à l'exercice.

Dans la méta-analyse, nous montrons que la supplémentation en NO_3^- réduit significativement le $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité sous-maximale, et plus particulièrement lorsque l'exercice est réalisé dans un domaine d'intensité de modérée à élevée. En revanche, l'effet des supplémentations en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ n'est pas significatif lors de l'exercice d'intensités difficile et maximale. Les effets du NO sur le coût en O_2 de la contraction musculaire semble disparaître quand l'intensité de l'exercice approche la capacité maximale des sujets. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de certaines études rapportant une réduction du coût en O_2 au cours de l'exercice d'intensité difficile après une supplémentation en NO_3^- (Bailey et al. 2009, 2010; Lansley et al. 2011b; Wylie et al. 2013a). Cependant, ces études ont été menées sur un faible échantillon d'individus, pouvant poser des limites à l'interprétation des résultats obtenus. Notre méta-analyse regroupe les études dans des modèles spécifiques selon le domaine d'intensité d'exercice et permet ainsi de réduire l'effet des limites inhérentes à un faible nombre de sujets inclus. L'ensemble des effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice et au repos est résumé dans la figure 11.

Concernant la condition de repos, le $\dot{V}O_2$ n'est pas significativement diminué à la suite de la supplémentation en NO_3^-. L'absence d'effet de la supplémentation en NO_3^- pourrait s'expliquer par les conditions physico-chimiques au niveau des muscles et organes ayant une activité métabolique élevée au repos. La réduction du NO_2^- en NO est augmentée lorsque la pression partielle en O_2 et le pH sont faibles, des conditions qui ne sont pas réunies au repos dans un contexte non pathologique (Cosby et al. 2003; Shiva et al. 2007; Lundberg et al. 2008). Une seule étude indique une tendance vers une diminution du $\dot{V}O_2$ au repos chez des patients atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Kenjale et al. 2011). Cependant, lorsque les études avec les plus larges effets ont été retirées de l'analyse, nous observons une tendance à la diminution du $\dot{V}O_2$ au repos dans la présente méta-analyse. La plupart des études incluses dans notre méta-analyse mesuraient le $\dot{V}O_2$ en condition considérée comme étant au repos avant le début de l'exercice, et sans que les participants aient eu pour instruction de jeûner la nuit précédant la visite. Le protocole d'une seule étude a en réalité été spécifiquement conçu afin de mesurer l'activité métabolique en condition stricte de repos (Larsen et al. 2014). Cette

étude montre une réduction significative de 4,2 % du $\dot{V}O_2$. Par ailleurs, Larsen et al. (2011a) indiquent que le NO_2^- in vitro augmente de façon dose dépendante la pression en O_2 nécessaire pour atteindre 50 % de la respiration mitochondriale maximale (p50). Cet effet est également observé après une supplémentation en NO_3^- ingérée par les sujets (Larsen et al. 2011a). Le p50 au niveau mitochondrial est négativement associé avec l'activité métabolique basale (Larsen et al. 2011b). Ainsi, la supplémentation en NO_3^- pourrait diminuer l'activité métabolique de repos. Une diminution de l'activité métabolique de repos à la suite d'une restriction calorique ou d'une supplémentation en resvératrol a par ailleurs été montrée comme étant associée à une amélioration de certaines variables liées à la santé métabolique et vasculaire, telles que la tension artérielle systolique, la sensibilité à l'insuline (Fontana et al. 2010; Timmers et al. 2011).

Concernant les effets de la supplémentation en NO_3^- dans le contexte de pathologies chroniques, une étude incluse dans la méta-analyse montre une augmentation du $\dot{V}O_{2max}$ chez des patients avec une insuffisance cardiaque après une supplémentation en jus de betterave rouge (Zamani et al. 2015). Cet effet est associé à un renforcement de la réserve vasodilatatrice et du débit cardiaque à la fin de l'exercice (Zamani et al. 2015). De plus, une autre étude rapporte une élévation du $\dot{V}O_{2max}$ à la suite d'une supplémentation en jus de betterave rouge de 15 jours chez des sujets sains (Vanhatalo et al. 2010). Cet effet serait dû à une augmentation de la perfusion musculaire et du débit cardiaque maximal.

Par ailleurs, en raison de l'absence d'une méta-régression dans les analyses réalisées, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si l'effet de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ présente une association avec le niveau d'aptitude aérobie ou d'entraînement des sujets. La large gamme de $\dot{V}O_{2max}$ des sujets inclus dans les études ainsi que le manque de report de l'historique d'entraînement ou de l'activité physique pratiquée, ne nous ont pas permis d'établir précisément des sous-groupes au sein des différentes populations étudiées. Toutefois, Porcelli et al. (2015) observent une corrélation négative entre le $\dot{V}O_{2max}$ et la réduction du coût en O_2 au cours de l'exercice d'intensité modérée, et une augmentation de la concentration plasmatique de NO_2^- inférieure, après une supplémentation en NO_3^- chez les sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 60 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$). De plus, de nombreuses études rapportent une absence d'effets de la supplémentation en NO_3^- chez des populations de sujets entraînés en endurance et présentant des valeurs de $\dot{V}O_{2max}$ comprises entre 60 et 80 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ (Peacock et al. 2012; Christensen et al. 2013; Boorsma et al. 2014; MacLeod et al. 2015; Sandbakk et al. 2015; Nyakayiru et al. 2017c; Nybäck et al. 2017).

ETUDE 2 :

La supplémentation en nitrate d'origine alimentaire n'améliore pas la tolérance à l'effort au cours d'un exercice intermittent supramaximal chez des athlètes entraînés en endurance

1. Introduction

La consommation de NO_3^- d'origine alimentaire peut améliorer la tolérance à l'effort au cours d'exercices d'intensités sous-maximale et maximale. Cette amélioration de la tolérance à l'effort était associée au cours de ces exercices à une augmentation de la puissance développée lors d'efforts de type contre-la-montre (Lansley et al. 2011a), à une diminution du coût en ATP de la contraction musculaire (Bailey et al. 2010), et à une amélioration de l'efficience mitochondriale (Larsen et al. 2011a). Cependant, plusieurs études n'ont pas rapporté d'amélioration de la tolérance à l'effort à la suite d'une supplémentation en NO_3^- (Peacock et al. 2012; Christensen et al. 2013; Boorsma et al. 2014; MacLeod et al. 2015; Nyakayiru et al. 2017c). L'absence d'effet de la supplémentation en NO_3^- a été majoritairement observée chez des athlètes entraînés en endurance, supportant l'hypothèse selon laquelle un niveau d'aptitude aérobie élevé affecte les effets de la supplémentation en NO_3^- sur la performance (Hoon et al. 2013; Porcelli et al. 2015; Carriker et al. 2016). Porcelli et al. (2015) montrent que le $\dot{V}O_{2max}$ des sujets (comprise entre 28,2 et 81,7 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) est négativement corrélé à la réduction du coût en O_2 à l'exercice sous-maximal et à l'amélioration de la performance durant un contre-la-montre de 3 km, à la suite d'une supplémentation en NO_3^-. A contrario, la majorité des études observant une amélioration de la tolérance à l'effort était conduite chez des sujets non entraînés en endurance ou modérément entraînés avec un $\dot{V}O_{2max} \approx 50$ $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ (Bailey et al. 2009, 2010; Lansley et al. 2011b; Wylie et al. 2013b, a; Thompson et al. 2014; Aucouturier et al. 2015). Les raisons de l'inefficacité de la supplémentation en NO_3^- chez les athlètes entraînés en endurance pourraient être liées aux adaptations physiologiques inhérentes à l'élévation du $\dot{V}O_{2max}$ en réponse à l'entraînement. Parmi ces adaptations physiologiques, une synthèse accrue de NO via la voie enzymatique (Totzeck et al. 2012) et une proportion de fibres de type 1 plus importante, lesquelles sont moins sensibles aux effets du NO_3^- comparativement aux fibres de type 2 (Jones et al. 2016), pourraient être les facteurs contribuant principalement à l'inefficacité de la supplémentation en NO_3^-.

Lors de l'exercice d'intensité supramaximale, les effets de la supplémentation en NO_3^- pourraient être potentialisés par l'émergence d'un environnement musculaire (caractérisé par un faible pH et par une diminution de la pression en O_2), propice à la réduction du NO_2^- en NO (Cosby et al. 2003; Shiva et al. 2007). Ces conditions permettraient une production du NO indépendante de la voie enzymatique, qui est, elle, dépendante de l'O_2 (Förstermann et Sessa 2012). Quelques études se sont intéressées aux effets de la supplémentation en NO_3^- à l'exercice

d'intensité supramaximale, avec des performances améliorées (Sandbakk et al. 2015; Aucouturier et al. 2015) ou inchangées (Martin et al. 2014) à la suite d'une supplémentation en NO_3^-. Ces études étaient conduites chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ compris entre 40 et 55 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$, et l'amélioration de la performance n'était pas associée à une réduction du coût en O_2 comme observée au cours d'exercices d'intensités sous-maximale et maximale. Nous avons précédemment rapporté qu'une supplémentation de jus de betterave rouge de 3 jours renforce la tolérance à l'effort chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max} \approx 50$ $mL.min^{-1}.kg^{-1}$, au cours d'un exercice intermittent supramaximal (170 % de la puissance maximale aérobie) (Aucouturier et al. 2015). L'amélioration de la performance était accompagnée d'un maintien de la perfusion musculaire au niveau du vaste latéral entre les phases d'exercice et de récupération, à la suite de la supplémentation en NO_3^- (Aucouturier et al. 2015).

L'objectif premier de cette étude était de déterminer si la supplémentation en NO_3^- améliore la tolérance à l'effort chez des sujets présentant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) lors d'un exercice intermittent supramaximal. L'objectif secondaire était de déterminer si un indice de perfusion musculaire est maintenu à un haut niveau lors des répétitions en réponse à la supplémentation en NO_3^-, comme précédemment trouvé chez des sujets modérément entraînés.

2. Méthodes

2.1 Population

Les sujets masculins ont été contactés par le biais de clubs de triathlon et de course à pied. Ces athlètes suivent un entraînement en endurance soutenu, et prennent part à des compétitions de course à pied et de triathlon. Onze sujets ont été initialement inclus dans l'étude, mais 2 sujets ne répondaient pas au critère d'inclusion ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}) après la visite préliminaire. Les sujets ne prenaient aucun supplément alimentaire ou médicament pouvant affecter le métabolisme du NO. Tous les sujets ont été informés du déroulement du protocole de l'étude, et ont donné leur consentement écrit pour participer à l'étude. Le réel objectif de l'étude n'était pas communiqué aux participants, mais il leur était indiqué que l'objet des expérimentations était de comparer les effets ergogéniques de deux boissons issues de produits végétaux. Après la participation à l'ensemble des visites expérimentales, nous nous sommes assurés que les sujets n'étaient toujours pas informés des propriétés suspectées de la supplémentation en NO_3^-, en les questionnant à nouveau. Le protocole de l'étude était en accord avec la déclaration d'Helsinki, et a été approuvé par le comité d'éthique de l'Haute Ecole Provinciale du Hainaut (Belgique). Les caractéristiques des sujets inclus dans l'étude sont présentées dans le tableau 2.

TABLEAU 2. Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude 2 (n=9)

Paramètres	**Valeurs**
Age (années)	21,7 ± 3,7
Masse corporelle (kg)	66,8 ± 8,5
Taille (m)	1,80 ± 0,07
Masse grasse (%)	11,1 ± 2,4
Puissance maximale aérobie (W)	327 ± 30
$\dot{V}O_{2max}$ (mL.kg^{-1}.min^{-1})	71,1 ± 5,2

Valeurs sont en moyenne ± ET.

2.2 Déroulement de l'étude

L'étude a été conçue de façon à être randomisée, transversale, en simple aveugle et contrôlée par placebo. Au cours d'une visite préliminaire, les sujets réalisaient une épreuve d'effort maximal afin de s'assurer de leur éligibilité au vu du principal critère d'inclusion ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}). Une fois l'épreuve d'effort maximal accomplie, les sujets se rendaient à deux reprises au laboratoire afin de réaliser un exercice intermittent supramaximal à chaque visite, laquelle était précédée de 3 jours de supplémentation en jus de betterave rouge riche en NO_3^- ou de pomme-cassis (condition placebo). Les 2 visites expérimentales étaient réalisées au même moment de la journée, et étaient séparées d'au moins 1 semaine et au maximum 2 semaines. La tolérance à l'effort était estimée par le nombre de répétitions de sprint effectuées jusqu'à l'épuisement au cours des exercices intermittents supramaximaux. La tension artérielle était relevée avant et après les exercices. Un prélèvement sanguin était effectué par la suite afin de mesurer les concentrations plasmatiques des oxydes d'azote (NO_x). Au cours des exercices, les échanges gazeux étaient mesurés par calorimétrie indirecte, et les changements d'oxygénation musculaire et du volume sanguin au niveau du vaste latéral étaient estimés à l'aide de la spectroscopie du proche infrarouge (NIRS).

2.3 Epreuve d'effort maximal

Le $\dot{V}O_{2max}$ et la puissance maximale aérobie ont été mesurés au cours d'une épreuve d'effort maximal sur une bicyclette ergométrique mécanique (894E, Monark exercise, Suède), réalisée 1 à 2 semaines avant la première visite expérimentale. Le test commençait à 100 watts (W) pendant 3 min, puis la charge augmentait de 35 W toutes les 2 minutes. Les sujets avaient pour consigne une fréquence de pédalage de 80 rotations par minute, et étaient verbalement encouragés par les expérimentateurs pour parvenir à un effort maximal. Les critères utilisés afin de s'assurer de l'atteinte du $\dot{V}O_{2max}$, en dehors de l'épuisement subjectif des sujets, étaient les suivants : une fréquence cardiaque maximale atteinte similaire à celle prédite théoriquement (220-âge ± 10 battements.min^{-1}), un quotient respiratoire (QR, $\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$) au-dessus de 1,1, et l'apparition d'un plateau au niveau du $\dot{V}O_2$. La puissance maximale aérobie correspondait à la puissance atteinte au dernier palier complété, à laquelle était additionné le produit du temps passé au dernier palier non complété et de la charge d'incrémentation (35 W).

2.4 Supplémentation en NO_3^- et en placebo

Les sujets ont été supplémentés soit en NO_3^- par le biais d'un jus de betterave rouge avec un contenu moyen en NO_3^- de 680 $mg.L^{-1}$, ou en placebo à l'aide d'un jus de pomme-cassis avec un contenu pauvre en $NO_3^- < 5$ $mg.L^{-1}$. L'apport calorique des 2 boissons était légèrement différent, avec 185 Kcal pour le jus de betterave rouge et 225 Kcal pour le jus de pomme-cassis. Les 2 boissons venaient d'un même fournisseur (Pajottenlander, Belgique). Le personnel distribuant les supplémentations aux participants n'était pas impliqué dans la réalisation des tests à l'exercice au cours des visites expérimentales. Les consignes données aux sujets, concernant le régime des supplémentations à suivre, étaient de : 1) prendre chaque matin, les 2 jours précédant les visites expérimentales, 500 mL de jus de betterave rouge ou 500 mL de jus de pomme-cassis ; 2) prendre, le jour de la visite expérimentale, 500 mL de jus de betterave rouge ou de placebo, 2h avant leur arrivée au laboratoire. Les sujets étaient invités à éviter la prise de café et d'alcool, respectivement, 6 et 24h avant les visites expérimentales. En outre, l'utilisation de solutions de bain de bouche était proscrite lors du protocole, et les sujets ne devaient pas se brosser les dents dans les 3h suivant la prise des supplémentations, afin d'éviter l'action d'agents anti-bactériens pouvant empêcher la conversion du NO_2^- en NO (Govoni et al. 2008).

2.5 Exercices intermittents supramaximaux

Les exercices intermittents supramaximaux étaient réalisés sur le même ergocycle que celui utilisé pour la visite préliminaire, et commençaient 180 min après la dernière ingestion de la supplémentation en jus de betterave rouge ou en placebo. Les sujets réalisaient un échauffement de 5 min à 50 % de leur puissance maximale aérobie, à une cadence de pédalage de 70 rotations par minute. Suite à une récupération de 2 min après l'échauffement, l'exercice intermittent supramaximal débutait, et consistait en une répétition de périodes actives de 15 s à 170 % de la puissance maximal aérobie, entrecoupées de périodes passives de 30 s. Les consignes données aux participants étaient d'atteindre, le plus rapidement possible, et de maintenir une fréquence de pédalage de 90 rotations par minute à chaque répétition entamée. Pour respecter ces consignes, un expérimentateur effectuait un décompte de 3 s, après lequel les sujets pédalaient sans charge jusqu'à 50 rotations par minute, ensuite la résistance était automatiquement appliquée jusqu'à la fin de la répétition. L'exercice intermittent

supramaximal était interrompu dès que les sujets indiquaient ne plus être en mesure de poursuivre l'exercice, ou s'ils n'étaient plus capables de maintenir une fréquence de pédalage supérieure à 87 rotations par minute, durant les 5 dernières secondes des 15 s de chaque répétition.

2.6 Mesure des échanges gazeux

Le $\dot{V}O_2$, le $\dot{V}CO_2$, le QR et la ventilation ($\dot{V}E$) étaient mesurés cycle à cycle au cours de l'épreuve d'effort maximal et des exercices intermittents supramaximaux à l'aide d'un système de mesure des échanges gazeux ($K4b_2$, Cosmed, Italie). Avant chaque mesure, l'analyseur des gaz était calibré avec l'air ambiant et un mélange de gaz de concentrations connues (O_2 : 16 %, CO_2 : 5 %), et le débitmètre était calibré avec une seringue de 3 L. Les échanges gazeux étaient enregistrés afin d'être analysés ultérieurement. La fréquence cardiaque était continuellement mesurée avec un cardiofréquencemètre (S810, Polard, Finlande).

2.7 Oxygénation et indice de perfusion au niveau musculaire

L'oxygénation, la désoxygénation et le volume sanguin au niveau musculaire étaient estimés continuellement au cours des exercices intermittents supramaximaux par le biais de la spectroscopie du proche infrarouge (Oxymon, Artinis Medical System BV, Pays-Bas). Le système de spectroscopie du proche infrarouge (NIRS) permet de mesurer les changements d'absorption de la lumière par l'hémoglobine (Hb) et la myoglobine (Mb), changements liés à la saturation en O_2 de l'Hb et la Mb. Les optodes émettant la lumière (780 et 850 nm) et les optodes réceptrices étaient séparées de 4 cm, et étaient placées à mi-distance entre le condyle du genou et le grand trochanter du fémur. Les optodes étaient fixées et maintenues sur la peau pour limiter les déplacements lors des exercices, et recouvertes d'un bandage sombre afin de minimiser la contamination de la lumière exogène. La localisation des optodes était relevée afin d'être reproduite entre les visites expérimentales. L'acquisition des signaux NIRS était effectuée à 10 Hz (Oxysoft, Artinis Medical System BV, Pays-Bas), et les données étaient extraites à 1 Hz pour l'analyse. Les 3 indices issus de la NIRS étaient exprimés par rapport aux valeurs enregistrées durant 2 min de repos. Les changements de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée représentent, respectivement, une estimation de l'apport et de l'utilisation de l'O_2,

alors que les changements de l'hémoglobine totale *(somme de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée)* est un indice de perfusion musculaire.

2.8 Tension artérielle au repos

Les sujets à leur arrivée au laboratoire étaient mis en position couchée sur une table d'examen médical durant 10 min. Ensuite, la tension artérielle systolique et diastolique ainsi que la fréquence cardiaque étaient mesurées, en dupliqué, à l'aide d'un sphygmomanomètre électronique (IntelliSense, Ormon, Pays-Bas).

2.9 Prélèvements sanguins et mesure des NO_x plasmatiques

À la suite de la mesure de la tension artérielle et 20 à 25 min après la fin de l'exercice, des prélèvements sanguins étaient effectués à travers un cathéter inséré dans la veine antécubitale. Le sang, 5 mL par prélèvement, était collecté dans des tubes EDTA. Les prélèvements sanguins étaient centrifugés à 3600 g et 4°C pendant 10 min, puis le plasma était récupéré et stocké à - 80°C jusqu'à l'analyse. La concentration plasmatique des NO_x a été déterminée par colorimétrie à l'aide de la méthode de Griess (Cayman NO_3^- colorimetric assay kit, Bertin Pharma, France).

2.10 Analyse des données

Les effets de la supplémentation en NO_3^-étaient déterminés par la comparaison des échanges gazeux et des paramètres dérivés de la NIRS entre les exercices intermittents supramaximaux sous les deux conditions *(jus de betterave rouge versus placebo)*. Le nombre de répétitions étant différent entre les 2 exercices, l'essai avec le nombre de répétitions le plus faible était utilisé comme référence. Les données des 3 derniers sprints (périodes active et passive) de cet essai étaient comparées à celles de l'essai avec le nombre de répétitions le plus élevé, de sorte que les répétitions comparées étaient alignées en fonction du temps. La moyenne des échanges gazeux était calculée sur l'ensemble de la durée de l'exercice, et sur les périodes actives et passives des répétitions, lesquelles étaient alignées en fonction du temps. L'amplitude

des changements du $\dot{V}O_2$, du $\dot{V}CO_2$ et du $\dot{V}E$ ($\Delta\dot{V}O_2$, $\Delta\dot{V}CO_2$ et $\Delta\dot{V}E$, respectivement) entre les périodes actives et passives durant les répétitions alignées sur le temps était également calculée.

Tous les paramètres dérivés de la NIRS étaient exprimés en changements relatifs par rapport aux valeurs enregistrées au repos. Les valeurs de repos étaient mesurées durant les 30 dernières secondes des 2 min de repos, où les sujets étaient en position assise juste avant la période d'échauffement. Les valeurs maximales de HHb et de THb, et les valeurs minimales et maximales de HbO_2 (HbO_{2min} et HbO_{2max}, respectivement) étaient déterminées pour chaque condition de supplémentation. Les aires sous la courbe pour HbO_2 (AUC-HbO_2+), HHb (AUC-HHb) et THb (AUC-THb) étaient calculées par la méthode trapézoïdale sur la durée des répétitions alignées sur le temps entre les 2 essais expérimentaux. L'estimation de l'aire sous la courbe a pour but de fournir un indice total de l'oxygénation et de la perfusion musculaires lors de l'exercice, étant donné que les paramètres dérivés de la NIRS changent constamment entre les périodes actives et passives. Comme les signaux de l'HbO_2 survenaient aussi en dessous des valeurs repos, l'aire sous la courbe pour l'HbO_2 relative à ces données était également calculée (AUC-HbO_2-).

2.11 Analyse statistique

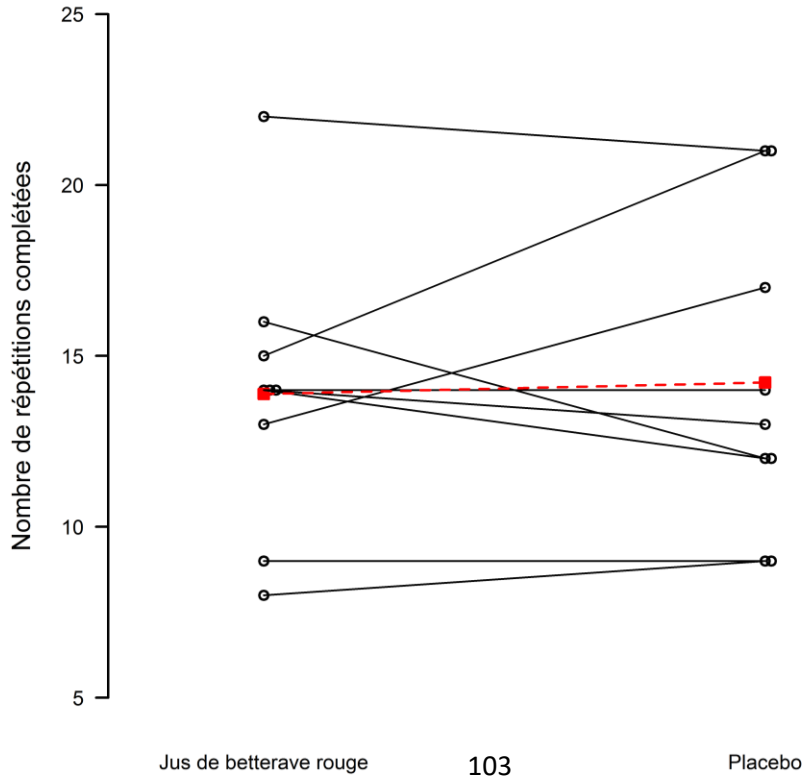
L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R (R version 3.2.5, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type, à moins qu'il en soit mentionné autrement. La normalité de la distribution était évaluée par un test de Kolmogorov-Smirnov. Un test de Student pour des données appariées a été utilisé afin de comparer les variables expérimentales durant les répétitions alignées sur le temps et l'ensemble de l'exercice. Les concentrations plasmatiques des NO_x ont été analysées par une ANOVA à double voie pour mesures répétées afin de comparer les conditions expérimentales (betterave rouge versus placebo) avant et après l'exercice intermittent supramaximal. L'analyse post-hoc a été ensuite réalisée pour variables dépendantes comme requis. La relation entre les changements de concentration plasmatique de NO_x et les changements au niveau de la tolérance à l'effort et les paramètres physiologiques a été évaluée par le calcul du coefficient de corrélation de Pearson. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$.

3. Résultats

3.1 Performance à l'exercice

La puissance cible correspondant à 170 % de la puissance maximale aérobie est de 555,3 ± 50,3 W. La puissance moyenne lors de l'exercice intermittent supramaximal est de 579,2 ± 57,7 W en condition de jus de betterave rouge, et de 578,9 ± 54,3 W en condition placebo (non significatif, NS). Le travail effectué au cours des exercices intermittents supramaximaux n'est pas différent entre les 2 conditions (jus de betterave rouge : 121 ± 38 KJ ; placebo : 121 ± 29 KJ, NS). Le nombre de répétitions complétées n'est pas différent entre la supplémentation en jus de betterave rouge et le placebo (13,9 ± 4,0 versus 14,2 ± 4,5 répétitions, respectivement, NS). Les performances individuelles sont présentées dans la Figure 12. Le nombre de répétitions complétées n'est pas significativement associé aux changements au niveau des concentrations plasmatiques des NO_x après les supplémentations. La tolérance à l'effort n'est pas affectée par l'ordre de passage des sessions expérimentaux (1ère test : 13,2 ± 3,7 répétitions ; 2ème test : 14,8 ± 4,6 répétitions, NS).

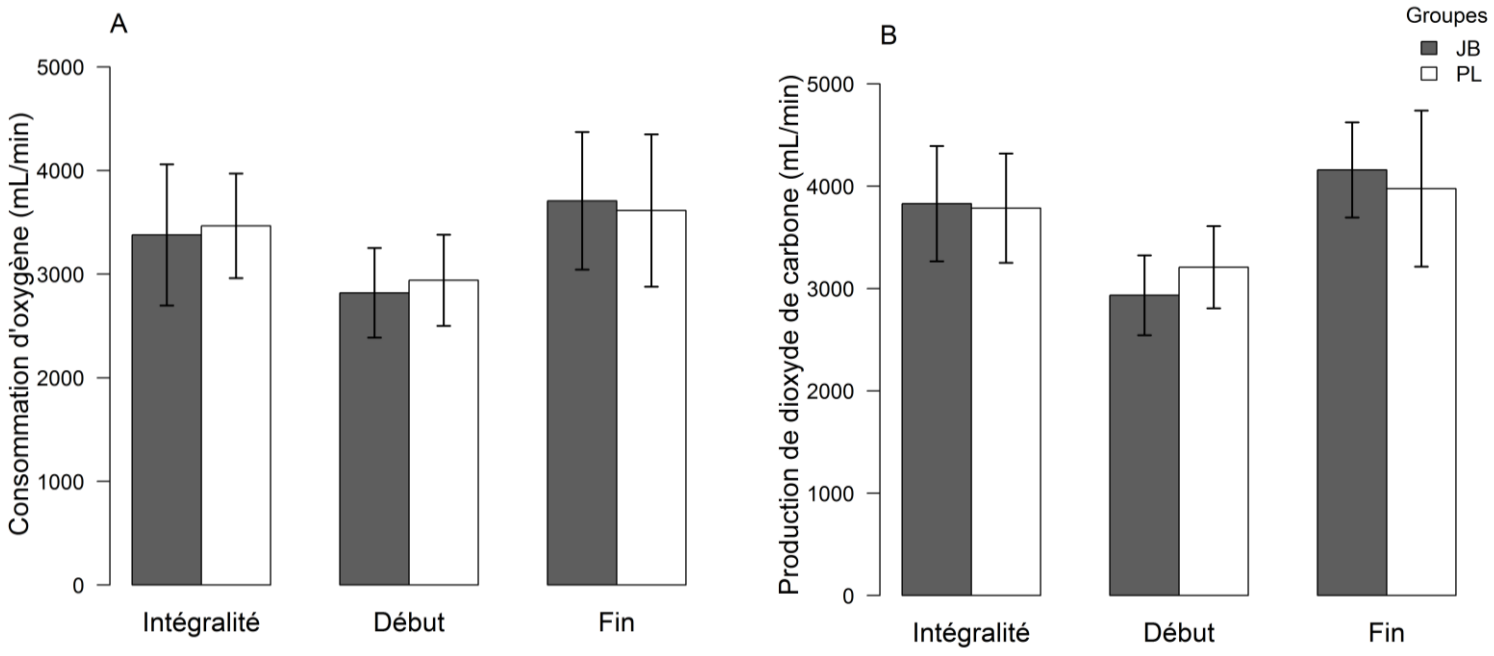
FIGURE 12. Nombre individuel de répétitions complétées avant l'épuisement au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale à la suite d'une supplémentation en jus betterave rouge et le placebo. Les carrés rouges indiquent le nombre moyen de répétitions complétées pour chaque condition de supplémentation.



3.2 Echanges gazeux et fréquence cardiaque

Aucune différence significative n'est observée au niveau du $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$, et le $\dot{V}E$ entre les 2 conditions (jus de betterave rouge versus placebo) pour l'ensemble de l'exercice et les répétitions alignées sur le temps. Les résultats sont présentés dans les Figures 13 et 14. La fréquence cardiaque est similaire entre la condition en jus de betterave rouge et en placebo pour l'ensemble de l'exercice (159,9 ± 9,0 versus 156,9 ± 15,4, respectivement) et les répétitions alignées sur le temps (170,4 ± 14,7 versus 172,0 ± 7,1, respectivement). Les échanges gazeux et la fréquence cardiaque ne sont pas différents au cours des 3 premiers périodes actives entre les 2 conditions (Cf. Tableau 3).

FIGURE 13. Variables du $\dot{V}O_2$ (A) et du $\dot{V}CO_2$ (B) au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale après le placebo (barres blanches) et la supplémentation en jus de betterave rouge (barres grises). Les données ont été calculées sur l'intégralité de l'exercice (Intégralité), les 3ères périodes actives et passives (Début), et les périodes actives et passives en fin d'exercice, alignées en fonction du temps (Fin).



Les fluctuations des échanges gazeux et de la fréquence cardiaque entre les périodes actives et passives ne sont pas différentes entre la supplémentation en jus de betterave rouge et le placebo (Cf. Tableau 3). Aucune association n'est trouvée entre les changements de $\dot{V}O_2$ et ceux de la concentration plasmatique des NO_x après les supplémentations.

FIGURE 14. Variables du $\dot{V}E$ (A) et de la fréquence cardiaque (B) au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale après le placebo (barres blanches) et la supplémentation en jus de betterave rouge (barres grises). Les données ont été calculées sur l'intégralité de l'exercice (Intégralité), les 3ères périodes actives et passives (Début), et les périodes actives et passives en fin d'exercice, alignées en fonction du temps (Fin).

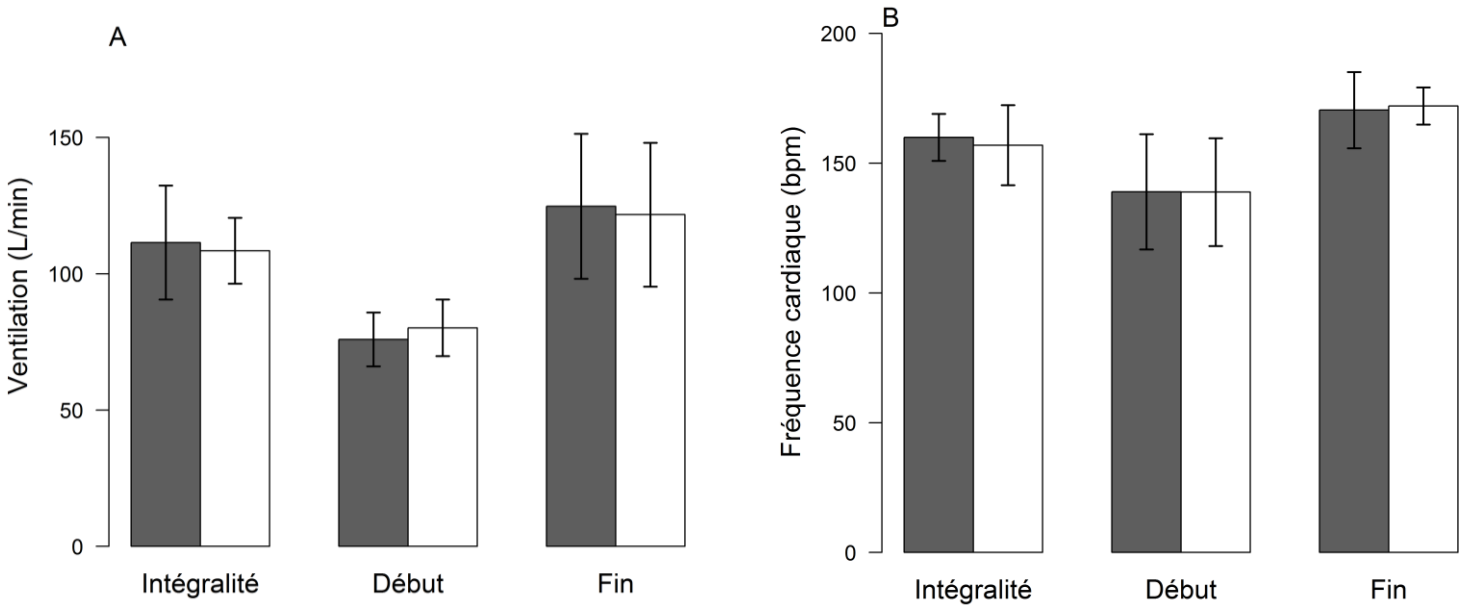


TABLEAU 3. Effets d'une supplémentation en jus de betterave rouge sur les paramètres des échanges gazeux et la fréquence cardiaque au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale

		Jus de betterave rouge	**Placebo**
$\dot{V}E$ (L.min^{-1})	3ères périodes actives	75,9 ± 9,9	80,2 ± 10,4
	Intégralité de l'exercice	111,4 ± 20,9	108,4 ± 12,1
	Périodes actives (TM)	141,1 ± 31,4	138,6 ± 31,7
	Périodes passives (TM)	97,6 ± 24,8	95,8 ± 21,4
	Δ Récupération-sprint	43,6 ± 20,0	42,7 ± 20,7
$\dot{V}O_2$ (mL.min^{-1})	3ères périodes actives	2819,3 ± 432,5	2940,7 ± 440,2
	Intégralité de l'exercice	3378,5 ± 681,8	3466,1 ± 505,3
	Périodes actives (TM)	3939 ± 664	3795 ± 789
	Périodes passives (TM)	3353 ± 751	3312 ± 670
	Δ Récupération-sprint	585 ± 173	483 ± 279
$\dot{V}CO_2$ (mL.min^{-1})	3ères périodes actives	2934,5 ± 390,6	3208,6 ± 402,3
	Intégralité de l'exercice	3830,0 ± 563,6	3785,7 ± 533,1

	Périodes actives (TM)	4523 ± 612	4405 ± 980
	Périodes passives (TM)	3705 ± 540	3522 ± 562
	Δ Récupération-sprint	818 ± 402	882 ± 457
QR	3ères périodes actives	1,05 ± 0,06	1,10 ± 0,17
	Intégralité de l'exercice	1,15 ± 0,12	1,10 ± 0,03
	Comparaison (TM)	1,14 ± 0,12	1,10 ± 0,05
Fréquence cardiaque (bpm)	3ères périodes actives	138,9 ± 22,2	138,8 ± 20,8
	Intégralité de l'exercice	159,9 ± 9,1	156,9 ± 15,4
	Périodes actives (TM)	171,1 ± 12,6	173,2 ± 11,1
	Périodes passives (TM)	160,5 ± 14,5	161,4 ± 13,1
	Δ Récupération-sprint	14,0 ± 9,7	11,8 ± 3,4

Valeurs sont en moyenne ± ET. QR : Quotient respiratoire, TM signifie données alignées en fonction du temps pour comparer des 3 périodes actives + passives successives, Δ indique les différences entre les périodes actives et passives.

3.3 Paramètres dérivés de la NIRS et tension artérielle de repos

La supplémentation en jus de betterave rouge n'a aucun effet sur la tension artérielle systolique et diastolique ainsi que la fréquence cardiaque au repos. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 4.

TABLEAU 4. Effets d'une supplémentation de jus de betterave rouge de 3 jours sur la fréquence cardiaque de repos et la tension artérielle

	Jus de betterave	**Placebo**
Tension artérielle diastolique (mmHg)	62,7 ± 8,9	64,0 ± 8,4
Tension artérielle systolique (mmHg)	125,4 ± 8,4	123,4 ± 9,4
Fréquence cardiaque (bpm)	64,4 ± 7,5	62,0 ± 9,0

Valeurs sont en moyenne ± ET.

Au repos, aucune différence significative n'est observée au niveau des paramètres dérivés de la NIRS entre les deux conditions. Au cours de l'exercice, les valeurs maximales de HbO_2, de HHb, et de THb, ne sont pas significativement différentes entre la supplémentation en jus de betterave rouge et le placebo. AUC-HbO_{2+}, AUC-HbO_{2-}, AUC-HHb et AUC-THb ne diffèrent pas entre la condition en jus de betterave rouge et en placebo. L'ensemble des paramètres dérivés de la NIRS est présenté dans le Tableau 5. Les changements au niveau des paramètres dérivés de la NIRS ne sont pas significativement associés aux changements de concentrations plasmatiques des NO_x après les supplémentations.

3.4 Concentrations plasmatiques des NO_x

Les concentrations plasmatiques des NO_x sont significativement augmentées après la supplémentation en jus de betterave rouge par rapport au placebo avant (jus de betterave rouge : 91,05 ± 30,01 µM ; placebo : 21,41 ± 7,59 µM, $p < 0,01$) et après l'exercice (jus de betterave rouge : 78,23 ± 14,67 µM ; placebo : 20,17 ± 6,17 µM, $p < 0,01$).

TABLEAU 5. Effets d'une supplémentation en jus de betterave rouge de 3 jours sur les paramètres dérivés de la spectroscopie du proche infrarouge et mesurés au niveau du vaste latéral au cours de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale

		Jus de betterave rouge	**Placebo**
HbO_2	Repos	39,3 ± 14,1	40,3 ± 14,1
	Maximal	14,3 ± 7,9	12,7 ± 3,8
	TM-AUC+	1710,8 ± 1083,7	1911,1 ± 1026,3
	Minimal	-14,5 ± 6,4	-15,0 ± 7,3
	TM-AUC-	3178,5 ± 1597,5	4013,3 ± 2166,7
HHb	Repos	45,1 ± 18,2	44,9 ± 17,7
	Maximal	25,6 ± 12,7	21,8 ± 6,5
	TM-AUC	6619,7 ± 875,8	6332,7 ± 1336,8
THb	Repos	83,0 ± 33,4	85,2 ± 31,2
	Maximal	15,4 ± 12,3	15,6 ± 5,2
	TM-AUC	6816,9 ± 1463,1	6771,5 ± 3004,5

Valeurs sont en moyenne ± ET. HbO_2 : hémoglobine oxygénée, HHb : hémoglobine désoxygénée, THb : hémoglobine totale, TM signifie données alignées en fonction du temps pour comparer des 3 périodes actives + passives successives.

4. Discussion

Dans notre étude 2, les objectifs étaient de déterminer 1) si la supplémentation en NO_3^- améliore la tolérance à l'effort chez des sujets entraînés en endurance lors d'un exercice intermittent supramaximal, et 2) si un indice de perfusion musculaire est maintenu à un niveau supérieur lors des répétitions de sprint en réponse à la supplémentation en NO_3^-.

Dans cette étude, nous n'observons aucune amélioration de la tolérance à l'effort, estimée par le nombre de répétitions de sprint effectuées, au cours d'un exercice intermittent d'intensité supramaximale à la suite d'une supplémentation en NO_3^- chez des sujets entraînés en endurance avec une aptitude aérobie élevée ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}). Ces résultats sont à l'opposé de ceux observés chez des sujets ayant une aptitude aérobie plus faible ($\dot{V}O_{2max} \leq$ 50 mL.min^{-1}.kg^{-1}), tels que les joueurs de sports collectifs (Wylie et al. 2013b; Aucouturier et al. 2015; Wylie et al. 2016a; Porcelli et al. 2016). À ce jour et sans prendre en considération la population recrutée, peu d'études se sont intéressées à l'effet ergogénique de la supplémentation en NO_3^- au cours de l'exercice intermittent supramaximal. Quelques études rapportent soit une altération (Martin et al. 2014), soit une amélioration (Aucouturier et al. 2015; Wylie et al. 2016a), ou une performance inchangée (Christensen et al. 2013; Martin et al. 2014; Sandbakk et al. 2015; Wylie et al. 2016a), à la suite de la supplémentation en NO_3^-.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences observées au cours de ces études comme les caractéristiques de la population, les conditions de supplémentation (durée et dose) et les modalités de l'exercice.

L'aptitude aérobie semble être le facteur majeur contribuant à l'absence d'effet de la supplémentation en NO_3^- sur la tolérance à l'effort, et ce quelle que soit l'intensité de l'exercice (Hoon et al. 2013; Porcelli et al. 2015; Carriker et al. 2016). À notre connaissance, notre étude est la première à explorer l'effet de la supplémentation en NO_3^- à l'exercice intermittent supramaximal chez des sujets avec un $\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}. De nombreuses études ont montré qu'une supplémentation en NO_3^- n'améliore pas la tolérance à l'effort pour des exercices d'intensité sous-maximale à maximale chez des sujets présentant des $\dot{V}O_{2max}$ supérieurs à 60 mL.min^{-1}.kg^{-1} (Peacock et al. 2012; Christensen et al. 2013; Boorsma et al. 2014; MacLeod et al. 2015; Porcelli et al. 2015; Sandbakk et al. 2015; Carriker et al. 2016; Nyakayiru et al. 2017c). Dans une autre étude utilisant les mêmes modalités d'exercice que

dans notre étude 2, nous avons trouvé une augmentation de 30 % du nombre de répétitions effectuées lors de l'exercice intermittent supramaximal après la supplémentation en jus de betterave rouge, chez des sujets avec un $\dot{V}O_{2max} \approx 50$ mL.min^{-1}.kg^{-1} (Aucouturier et al. 2015). Le nombre de répétitions réalisées dans notre étude 2 est nettement inférieur chez les sujets ayant une aptitude aérobie élevée (jus de betterave rouge : 13,9 ± 4,0 ; placebo : 14,2 ± 4,5) par rapport aux sujets ayant une aptitude aérobie modérée (jus de betterave rouge : 26,1 ± 10,7 ; placebo : 21,8 ± 8,0) (Aucouturier et al. 2015). Les sujets présentant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé disposent d'une proportion importante de fibres musculaires de type 1, et une faible proportion de fibres musculaires de type 2 (Abernethy et al. 1990). Ainsi, l'ensemble de ces observations semble soutenir l'hypothèse que l'efficacité de la supplémentation en NO_3^- serait spécifiquement liée aux effets du NO au niveau des fibres de type 2 (Jones et al. 2016). Chez l'animal, la supplémentation en NO_3^- augmente la force produite dans les muscles composés majoritairement de fibres de type 2, mais cet effet n'est pas trouvé dans les muscles constitués principalement de fibres de type 1 (Hernández et al. 2012). Chez l'homme, la supplémentation en NO_3^- augmente la force maximale en réponse à une stimulation électrique de 1-20 Hz (Haider et Folland 2014), et la puissance développée au cours d'extension de la jambe de vitesse modérée à rapide en contraction isocinétique (Coggan et al. 2015). Au vu de ces éléments, l'augmentation de la biodisponibilité du NO via la supplémentation en NO_3^- peut être particulièrement efficace chez des sujets issus de populations caractérisées par une proportion importante de fibres musculaires de type 2 (Aucouturier et al. 2015), ou lors des exercices recrutant une forte proportion de fibres musculaires de type 2 (Breese et al. 2013; Jones et al. 2016).

Concernant les modalités d'exercice, Wylie et al. (2016a) montrent qu'au sein d'une même population, la durée et l'intensité des périodes actives et passives lors d'exercices intermittents déterminent l'efficacité de la supplémentation en NO_3^- chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max} \approx 60$ mL.min^{-1}.kg^{-1}. À la suite de la supplémentation en NO_3^-, la puissance développée est accrue lors de l'exercice de sprints maximaux comprenant des périodes actives courtes (6 s) entrecoupées de périodes passives également courtes (24 s), alors qu'aucune différence avec la condition placebo n'est observée lors de l'exercice contenant des périodes longues actives (de 30 s à 60 s) et passives (de 60 s à 240 s) (Wylie et al. 2016a). Dans cette étude, le $\dot{V}O_2$ moyen est supérieur au cours des périodes actives courtes, et reste élevé lors des périodes passives courtes comparativement à celui mesuré lors des périodes longues. Les modalités d'exercice utilisées dans la présente étude ont antérieurement montré un effet ergogénique de la

supplémentation en NO_3^- chez des sujets présentant une aptitude aérobie modérée ($\dot{V}O_{2max} \approx$ 50 mL.min^{-1}.kg^{-1}). Cependant, la population dans l'étude de Wylie et al. (2016a) présente un $\dot{V}O_{2max} \approx$ 60 mL.min^{-1}.kg^{-1} qui est proche de la valeur pouvant servir de point de démarcation dans la détermination du niveau d'aptitude aérobie considéré comme élevé (De Pauw et al. 2013). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que des modalités différentes lors des exercices intermittents, permettant d'atteindre un pourcentage élevé de $\dot{V}O_{2max}$, sont nécessaires pour observer des effets de la supplémentation en NO_3^-, chez des sujets ayant une aptitude aérobie élevée ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}). Dans notre étude, le pourcentage de $\dot{V}O_{2max}$ (75 %) atteint lors des répétitions de sprint est similaire à celui rapporté dans l'étude de Martin et al. (2014), qui ne trouvent pas d'amélioration de la performance lors des sprints à la suite d'une supplémentation en NO_3^-. En revanche, dans notre précédente étude (Aucouturier et al. 2015), utilisant les mêmes modalités d'exercice chez des sujets avec une aptitude aérobie modérée, la moyenne du $\dot{V}O_2$ atteint correspond à 85 % du $\dot{V}O_{2max}$. Elle s'accompagne d'une augmentation du nombre de répétitions complétées de 30 % à la suite de la supplémentation en jus de betterave rouge (Aucouturier et al. 2015).

Une dose plus importante et/ou une durée de supplémentation en NO_3^- ont été suggérées comme des moyens pouvant élever notablement les concentrations plasmatiques de NO_3^- et de NO_2^- chez les sujets entraînés en endurance (Boorsma et al. 2014; Porcelli et al. 2015), lesquels ont déjà des niveaux plasmatiques basaux de NO_3^- et de NO_2^- supérieurs à ceux des sujets sains sédentaires ou actifs (Jungersten et al. 1997; Totzeck et al. 2012). Chez des rameurs très entraînés, une amélioration de la performance est observée lors d'un effort de type contre-la-montre de 2000 m sur rameur, à la suite d'une supplémentation de NO_3^- à une dose de 8,4 mmol, mais aucune amélioration n'est trouvée pour une dose ingérée de 4,2 mmol de NO_3^- (Hoon et al. 2014). Dans notre étude, la dose ingérée par les participants (5,2 mmol/jour) est légèrement supérieure à la dose minimale utilisée dans l'étude de Hoon et al. (2014). Cette dose pourrait être insuffisante pour induire des effets physiologiques significatifs. Cependant, aucune amélioration de la performance sur un effort de type contre-la-montre de 1500 m chez des coureurs de demi-fond de bon niveau ($\dot{V}O_{2max} \approx$ 80 mL.min^{-1}.kg^{-1}) n'est rapportée après une supplémentation de NO_3^- avec des doses de NO_3^- jusqu'à 19,5 mmol, doses prises de façon aigue ou sur 8 jours (Boorsma et al. 2014). En outre, certaines études rapportent que les niveaux plasmatiques de NO_2^- au repos ne diffèrent pas entre les athlètes élites ($\dot{V}O_{2max}$ compris entre 65 et 80 mL.min^{-1}.kg^{-1}) et les sujets non-athlètes ($\dot{V}O_{2max}$ compris entre 30 et 50 mL.min^{-1}.kg^{-1}) (Porcelli et al. 2015; Christensen et al. 2017). De plus, une supplémentation aigue de NO_3^-

chez des athlètes élites, à une dose similaire à celle utilisée chez des sujets non entraînés, est en mesure d'accroître significativement les concentrations plasmatiques de NO_3^- et de NO_2^-, mais sans aucun changement au niveau de la tolérance à l'effort (Peacock et al. 2012; Sandbakk et al. 2015). Dans notre étude, l'augmentation des concentrations plasmatiques des NO_x après la supplémentation en NO_3^- est inférieure à celle mesurée dans de précédentes études portant sur des sujets à aptitude aérobie élevée (Peacock et al. 2012; Boorsma et al. 2014; Sandbakk et al. 2015; Christensen et al. 2017). Les concentrations plasmatiques des NO_x dans notre étude sont similaires à celles rapportées en condition placebo et supplémentée en NO_3^-dans l'étude de Porcelli et al. (2015), qui procèdent au même traitement des échantillons sanguins que celui utilisé dans la présente étude. Ainsi, de futures études sont nécessaires pour établir plus précisément la relation entre la dose de NO_3^- ingérée et les effets ergogéniques supposés de la supplémentation en NO_3^- dans des populations ayant une aptitude aérobie élevée ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$).

Concernant la durée de la supplémentation en NO_3^-, la puissance maximale aérobie est accrue à la suite d'une supplémentation en NO_3^- de 15 jours par comparaison à la condition placebo chez des sujets sains et actifs (Vanhatalo et al. 2010). Cet effet n'est pas observé dans cette population après une supplémentation aigue et de 5 jours en NO_3^- (Vanhatalo et al. 2010). À ce jour, aucune étude n'a exploré les effets d'une supplémentation en NO_3^- d'une durée aussi longue chez des sujets entraînés en endurance présentant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$). Cependant, une supplémentation en NO_3^- de 8 jours n'apporte aucun bénéfice supplémentaire chez des athlètes avec un $\dot{V}O_{2max}$ élevé par rapport à une supplémentation en NO_3^- aigue (Boorsma et al. 2014) ou d'une durée de 6 jours (Nyakayiru et al. 2017c). De plus, l'ampleur de l'augmentation des concentrations plasmatiques de NO_2^- et de NO_3^- n'est pas différente entre les supplémentations en NO_3^- d'une durée de 6 et 8 jours (Nyakayiru et al. 2017c). Ainsi, une durée de supplémentation en NO_3^- plus longue pourrait être nécessaire afin d'observer des effets physiologiques chez des sujets présentant une aptitude aérobie élevée.

Dans notre étude, nous n'observons pas d'effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$ et la désoxygénation musculaire chez les sujets entraînés en endurance au cours de l'exercice intermittent supramaximal. Breese et al. (2013) rapportent des cinétiques de $\dot{V}O_2$ et de désoxygénation musculaire plus rapides lors de la transition d'une intensité modérée à difficile lors de l'exercice après la supplémentation en NO_3^-. Selon ces auteurs, les résultats s'expliqueraient par une augmentation du niveau intracellulaire de calcium dans les fibres musculaires de type 2, laquelle activerait le métabolisme oxydatif. Une extraction en O_2 accrue

au niveau des fibres musculaires de type 2, durant la transition à l'exercice vers des intensités élevées, pourrait limiter la dégradation de la PCr et réduire la contribution de la glycolyse dans la production d'ATP (Breese et al. 2013). Le caractère intermittent de l'exercice avec des périodes actives de courte durée nous empêche d'effectuer une analyse de la cinétique du métabolisme oxydatif dans cette étude. Néanmoins, aucune différence significative n'est trouvée au niveau des échanges gazeux au cours des 3 premières répétitions entre la supplémentation en jus de betterave rouge et le placebo. Ainsi, le NO_3^- n'apparait pas affecter la cinétique du métabolisme oxydatif au cours de l'exercice intermittent supramaximal chez les sujets ayant une aptitude aérobie élevée.

À notre connaissance, aucune étude n'a exploré l'effet de la supplémentation en NO_3^- sur l'apport et l'extraction en O_2 estimés par la spectroscopie du proche infrarouge chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}). Nous n'observons aucune différence au niveau de la désoxygénation et du volume sanguin, estimés au niveau du vaste latéral, entre les conditions (supplémentation en jus de betterave rouge versus placebo) au cours de l'exercice intermittent supramaximal. Ces résultats sont contraires à ceux rapportés chez les sujets avec un $\dot{V}O_{2max}$ modéré (Aucouturier et al. 2015), lesquels présentent un renforcement du volume sanguin au niveau musculaire suggérant une redistribution du débit sanguin vers les fibres musculaires de type 2, redistribution due à une hausse de la vasodilatation dépendante du NO par l'intermédiaire de la réduction du NO_2^-. Ces précédents résultats pourraient expliquer l'amélioration de la tolérance à l'effort chez les sujets ayant un $\dot{V}O_{2max} \approx 50$ mL.min^{-1}.kg^{-1}, par un maintien de la perfusion musculaire dépendante du NO sous supplémentation en NO_3^- (Grassi et al. 2011; Aucouturier et al. 2015). Ainsi, la supplémentation en NO_3^- chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}) et dotés d'une forte proportion de fibres musculaires de type 1, ne renforce pas l'indice de perfusion musculaire estimé par la spectroscopie du proche infrarouge, lors de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale.

ETUDE 3 :

Les concentrations plasmatiques de diméthylarginine asymétrique ne sont pas associées à l'aptitude aérobie chez des sujets jeunes et sains

1. Introduction

Comme précédemment mentionné, l'aptitude aérobie est un facteur indépendant, prédictif des risques cardiovasculaires (Williams 2001; Myers et al. 2002). Les patients atteints de pathologies cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque ou l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs présentent une aptitude aérobie limitée, qui est, par ailleurs, associée à un niveau plasmatique de diméthylarginine asymétrique (ADMA) élevé (Wilson et al. 2010; Seljeflot et al. 2011). L'ADMA est un inhibiteur endogène de la NO synthase, conduisant à la diminution de la vasodilatation dépendante du NO (Ardigo et al. 2007). Chez les athlètes, qu'ils soient jeunes ou âgés, la fonction microvasculaire est renforcée par rapport aux sujets appariés en âge, n'ayant pas une activité physique régulière (Montero et al. 2015). La fonction microvasculaire est positivement associée à un faible risque cardiovasculaire (Anderson et al. 2011), et contribue au maintien d'un profil métabolique équilibré (Bakker et al. 2009). Les bénéfices de l'activité physique semblent principalement agir sur le système vasculaire, indépendamment des facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels (Joyner et Green 2009). Mais, les médiateurs des effets protecteurs de l'entraînement sur le système vasculaire restent à identifier précisément.

Chez les patients présentant une pathologie cardiovasculaire, la dysfonction microvasculaire conduit à une altération du débit sanguin et de l'apport en O_2 aux muscles squelettiques lors de l'exercice (Sperandio et al. 2012). Ces altérations induisent un déséquilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 aux muscles actifs, pouvant ainsi limiter l'aptitude aérobie chez ces patients (Takagi et al. 2014). Toutefois, malgré l'association rapportée entre l'aptitude aérobie et l'ADMA chez des patients atteints de pathologies cardiovasculaires (Wilson et al. 2010; Seljeflot et al. 2011), aucune étude n'a exploré si le $\dot{V}O_{2max}$ et l'apport en O_2 au niveau musculaire sont liés à la concentration plasmatique ADMA en l'absence de pathologies déclarées. Ceci ferait de l'ADMA, un médiateur dans la régulation du débit sanguin et l'apport en O_2 aux muscles squelettiques au cours de l'exercice.

L'objectif premier de cette étude est de déterminer si les concentrations plasmatiques d'ADMA présentent une association à l'aptitude aérobie chez des sujets jeunes et sans pathologies cardiovasculaires ou désordres métaboliques *($\dot{V}O_{2max}$: > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}, groupe avec une aptitude aérobie élevée ; < 45 mL.min^{-1}.kg^{-1}, groupe avec aptitude aérobie faible)*. L'objectif secondaire est de déterminer si les différences de cinétiques de désoxygénation

musculaire, laquelle est estimée par la spectroscopie du proche infrarouge, au cours de l'exercice, sont associées aux concentrations plasmatiques d'ADMA. La modélisation de la cinétique de désoxygénation musculaire a été proposée comme un outil pouvant évaluer la fonction microvasculaire, où un déplacement du profil de désoxygénation musculaire vers la gauche ou vers la droite peut indiquer, respectivement, une altération ou un renforcement de la fonction microvasculaire (Ferreira et al. 2007).

2. Méthodes

2.1. Population

Vingt sujets étaient inclus dans l'étude. Ils ne présentaient pas de pathologies cardiovasculaires et métaboliques, selon l'historique médicale ou l'un examen clinique. Les participants étaient séparés en 2 groupes en fonction de leur $\dot{V}O_{2max}$ et de leur puissance maximale aérobie, qui étaient évalués au cours d'une épreuve d'effort maximal. Les sujets potentiellement éligibles pour intégrer le groupe avec une aptitude aérobie élevée (HI-FIT, n=10) étaient des athlètes entraînés en endurance et participaient régulièrement à des compétitions. Les sujets potentiellement éligibles pour être inclus dans le groupe ayant une faible aptitude aérobie (LO-FIT, n=10) étaient recrutés à partir d'une liste de volontaires pour des études à l'exercice, et ne pratiquaient pas plus de 3 h d'activités physiques structurées par semaine. Les participants avaient tous donné leur consentement écrit pour prendre part à l'étude, et étaient informés du protocole et des objectifs de l'étude. Les critères d'inclusion étaient pour le groupe HI-FIT : un $\dot{V}O_{2max}$ > 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ et/ou une puissance maximale aérobie comprise entre 4,9 et 6,4 $W.kg^{-1}$; contre pour le groupe LO-FIT : un $\dot{V}O_{2max}$ < 45 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ et/ou une puissance maximale aérobie < 4,0 $W.kg^{-1}$. Ces critères étaient basés sur les recommandations pour classifier les groupes de sujets en recherche en sciences du sport, et correspondent à des niveaux de performance de 1 et 4, respectivement (De Pauw et al. 2013). Les caractéristiques des sujets sont présentées dans le Tableau 6. Les participants ne prenaient pas de médicaments pouvant affecter le métabolisme du NO, ni les réponses cardiovasculaires et hémodynamiques à l'exercice. La présente étude est en accord avec la déclaration d'Helsinki, et a été approuvée par le comité d'éthique de la Haute Ecole Provinciale du Hainaut (Belgique).

2.2 Déroulement de l'étude

Les sujets se sont rendus au laboratoire afin de réaliser une épreuve d'effort maximal, durant laquelle le $\dot{V}O_{2max}$ et le profil de la désoxygénation musculaire étaient évalués. Les échanges gazeux étaient mesurés à l'aide de la calorimétrie indirecte. Les changements de la désoxygénation au niveau du vaste latéral étaient estimés par la spectroscopie du proche infrarouge (NIRS). Des prélèvements veineux étaient réalisés avant et après l'exercice afin de déterminer les concentrations plasmatiques de l'ADMA et des dérivés de la L-arginine.

TABLEAU 6. Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude 3

	Groupes		
	HI-FIT (n = 10)	LO-FIT (n = 10)	
$\dot{V}O_{2max}$ (mL.min^{-1}.kg^{-1}) #	70,2 (71,9 – 68,0)	43,8 (45,3 – 34,8)	*
Puissance maximale aérobie (W.kg^{-1}) #	5,3 (5,5 – 4,9)	3,4 (3,5 – 2,8)	*
FC maximale (battements.min^{-1}) #	180,0 (187,0 – 179,3)	188,0 (190,8 – 182,5)	
Age (années)	25,6 ± 7,0	27 ± 6,2	
Masse corporelle (kg)	67,9 ± 9,7	77,2 ± 7,9	
Taille (cm)	178,7 ± 8,0	181,0 ± 4,4	
IMC (kg.m^{-2})	21,2 ± 1,9	23,5 ± 2,0	*
Masse grasse (%)	10,3 ± 1,7	15,4 ± 3,0	*

Valeurs sont en moyenne ± ET. # : les variables ne respectant pas la normalité sont présentées en médiane et écart interquartile (75^{th} – 25^{th}). HI-FIT : groupe avec aptitude aérobie élevée ; LO-FIT : groupe avec aptitude aérobie faible ; IMC : Indice de Masse Corporelle ; FC : Fréquence cardiaque. * : $p < 0,05$.

2.3 Epreuve d'effort maximal

Le $\dot{V}O_{2max}$ et la puissance maximale aérobie étaient mesurés au cours d'une épreuve d'effort maximal sur une bicyclette ergométrique mécanique (894E, Monark Exercice AB, Suède). La charge initiale et l'incrémentation de la charge étaient adaptées pour chaque groupe afin d'atteindre un épuisement dans les 12 à 20 min après le début de l'exercice. La charge initiale était fixée à 100 W et 35 W dans le groupe HI-FIT et LO-FIT, respectivement ; l'incrémentation de la charge étaient de 35 W et 20 W toutes les 2 min dans le groupe HI-FIT et LO-FIT, respectivement. L'atteinte du $\dot{V}O_{2max}$ était confirmée par la présence d'au moins 3 des critères suivants : l'épuisement volontaire du sujet, l'atteinte de la fréquence cardiaque maximale théorique (220-âge ± 10 battements.min^{-1}), QR au-dessus de 1,1, et de l'émergence d'un plateau du $\dot{V}O_2$ entre les 2 derniers paliers. La puissance maximale aérobie était calculée comme la somme de la puissance au dernier palier complété, et l'incrémentation de la charge, laquelle est multipliée par le temps passé dans le dernier palier entamé.

2.4. Mesure des échanges gazeux

Le $\dot{V}O_2$, le $\dot{V}CO_2$, le QR et la ventilation ($\dot{V}E$) étaient mesurés cycle à cycle au cours de l'épreuve d'effort maximal et des exercices intermittents supramaximaux à l'aide d'un système de mesure des échanges gazeux (K4b$_2$, Cosmed, Italie). Avant chaque mesure, l'analyseur des gaz était calibré avec l'air ambiant et un mélange de gaz de concentrations connues (O_2 : 16 %, CO_2 : 5 %), et le débitmètre était calibré avec une seringue de 3 L. Les échanges gazeux étaient enregistrés afin d'être analysés ultérieurement. La fréquence cardiaque était continuellement mesurée avec un cardiofréquencemètre (S810, Polard, Finlande).

2.5. Désoxygénation musculaire

La désoxygénation musculaire (HHb) était mesurée continuellement au cours de l'épreuve d'effort maximal à l'aide de la spectroscopie du proche infrarouge (Oxymon, Artinis Medical System BV, Pays-Bas). Le système de spectroscopie du proche infrarouge (NIRS) est composé d'une optode émettrice qui transmet la lumière produite (780 et 850 nm) au tissu d'intérêt, et d'une optode réceptrice qui reçoit la lumière revenant du tissu afin de la transmettre

à un spectromètre. Dans le tissu musculaire, les signaux de la NIRS émanent principalement de l'absorption de la lumière par l'hémoglobine (Hb) et la myoglobine (Mb), qui est liée à leur saturation en O_2. Les optodes émettrices et réceptrices étaient séparées de 4 cm, et étaient placées au niveau du vaste latéral, à mi-distance entre le condyle du genou et le grand trochanter du fémur. Les optodes étaient fixées et maintenues sur la peau pour limiter les déplacements, et recouvertes d'un bandage sombre afin de minimiser la contamination de sources lumineuses. La localisation des optodes était relevée afin de vérifier si aucun déplacement de dispositif n'avait eu lieu au cours de l'exercice. L'acquisition des signaux NIRS était effectuée à 10 Hz (Oxysoft, Artinis Medical System BV, Pays-Bas), et les données étaient extraites à 1 Hz pour l'analyse.

2.6. Cinétique de la désoxygénation musculaire

Concernant les données du $\dot{V}O_2$, les points aberrants dépassant une bande passante de 4 écart-types par rapport à la moyenne locale étaient retirés, et les données étaient ensuite interpolées en intervalle d'une seconde. Les données du $\dot{V}O_2$ étaient décalées de 20 s pour prendre en compte le temps de transit de l'O_2 du muscle vers les poumons (Murias et al. 2011), de sorte que les changements du $\dot{V}O_2$ pulmonaire correspondent à ceux au niveau musculaire. En raison d'une incertitude sur le trajet de la lumière au sein du muscle, les données de HHb étaient exprimées en changements relatifs par rapport aux valeurs de repos (Δ[HHb]), lesquelles étaient enregistrées lors des 30 dernières secondes d'une période de repos de 2 min en position assise. La réponse du $\dot{V}O_2$ et de la Δ[HHb] était alignée en fonction du temps, et normalisée de façon à ce que 100 % représentaient la moyenne des 30 dernières secondes du dernier palier de l'épreuve d'effort maximal. Ce dernier palier, pour être comptabilisé, devait être maintenu au moins 90 s par le sujet. Compte tenu des différences inter-individuelles dans la survenue de l'épuisement au cours de l'épreuve d'effort maximal, les réponses du $\dot{V}O_2$ et de la Δ[HHb] étaient réduites en 100 échantillons égaux pour permettre une comparaison directe entre les groupes HI-FIT et LO-FIT.

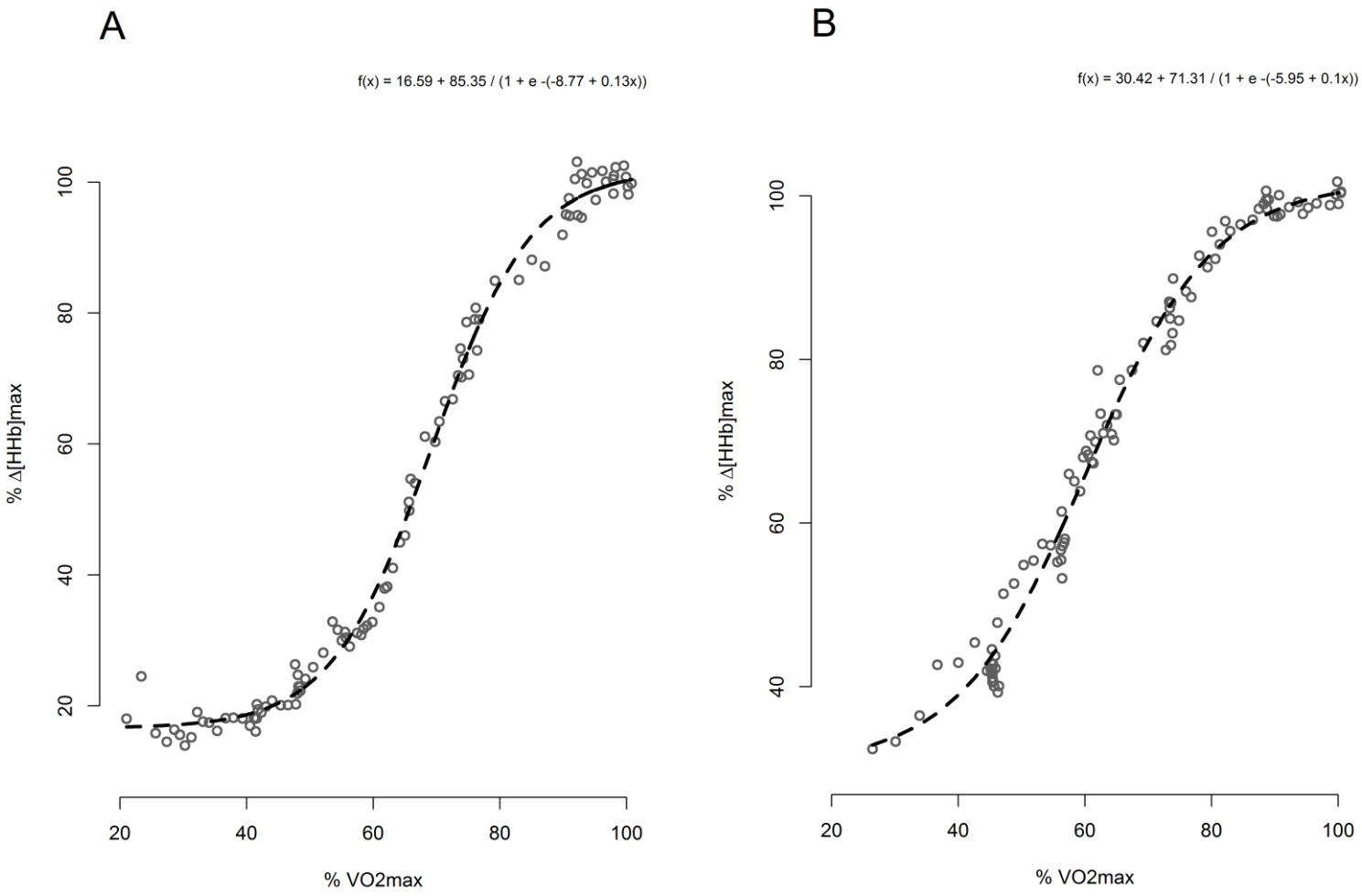
La réponse normalisée de la Δ[HHb] était exprimée en fonction du $\%\dot{V}O_{2max}$ au cours de l'épreuve d'effort maximal, et était modélisée à travers le modèle sigmoïde suivant :

$$F(x) = f_0 + A/(1 + \exp^{-(-c+dx)})$$

Où f_0 représente le niveau de repos exprimé en % $\Delta[HHb]_{max}$, A est l'amplitude de la réponse, d est la pente du modèle sigmoïde, c est une constante qui dépend de d, c/d est la valeur de x qui correspond à 50 % de l'amplitude de la réponse totale.

La Figure 15 montre le profil de la désoxygénation musculaire au cours de l'épreuve de l'effort maximal de 2 sujets représentatifs du groupe HI-FIT et LO-FIT.

FIGURE 15. Profil de la désoxygénation musculaire au cours de l'épreuve d'effort maximal, estimée chez des sujets représentatifs du groupe LO-FIT (Figure A) et du groupe HI-FIT (Figure B). % $\dot{V}O_{2max}$: pourcentage de la consommation maximale d'oxygène ; % $\Delta[HHb]_{max}$: pourcentage de l'amplitude de la désoxygénation musculaire par rapport au repos.



2.7. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins étaient collectés dans des tubes EDTA à partir d'une veine antécubitale avant et 15 min après l'épreuve d'effort maximal, avec les sujets en position semi-couchée. Les prélèvements sanguins étaient centrifugés à 3600 g et 4°C pendant 10 min, le plasma était aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à l'analyse. Les concentrations plasmatiques de L-arginine, de diméthylarginine asymétrique (ADMA), de diméthylarginine symétrique (SDMA), de citrulline et d'Homoarginine étaient mesurées par une méthode couplant la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) (Shin et al. 2011; Martens-Lobenhoffer et al. 2013). La méthode de la LC-MS/MS est considérée comme la méthode référence pour la mesure de ces analytes (Martens-Lobenhoffer et Bode-Böger 2007).

2.8 Analyse statistique

L'analyse complète des données et la modélisation sigmoïde ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R version 3.2.5, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type, à moins qu'il en soit mentionné autrement. La normalité de la distribution et l'hétéroscédasticité des données étaient évaluées par un test de Shapiro-Wilk et un test de Levene, respectivement. Les caractéristiques des sujets étaient comparées par l'intermédiaire d'un test de Student pour variables indépendantes ou d'un test Mann-Whitney-Wilcoxon. L'ajustement du modèle sigmoïde sur les données réelles était comparé entre les groupes HI-FIT et LO-FIT en utilisant un test Mann-Whitney-Wilcoxon. Cet ajustement comprenait comme paramètres : la valeur du R^2, la somme résiduelle des moindres carrés et l'estimation de l'erreur standard. Les paramètres dérivés du modèle sigmoïde de la réponse de Δ[HHb] en fonction du $\%\dot{V}O_{2max}$ étaient également comparés avec un test Mann-Whitney-Wilcoxon. Les concentrations plasmatiques d'ADMA et des dérivés de la L-arginine étaient analysées par une ANOVA à double voie pour des mesures répétées, avec comme facteurs principaux l'aptitude aérobie et le temps *(avant versus après l'exercice)*. Leur interaction était aussi évaluée. Par la suite, une analyse de post-hoc était réalisée avec une correction de Benjamini-Hochberg pour des prélèvements dépendants et indépendants. La relation entre le $\dot{V}O_{2max}$ et les concentrations plasmatiques de l'ensemble des dérivés de la L-arginine était estimée à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson. L'association de la réponse sigmoïde de Δ[HHb] avec l'aptitude aérobie et les concentrations plasmatiques des dérivés de la L-arginine était estimée en utilisant la valeur du rho de Spearman. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Concentrations plasmatiques d'ADMA

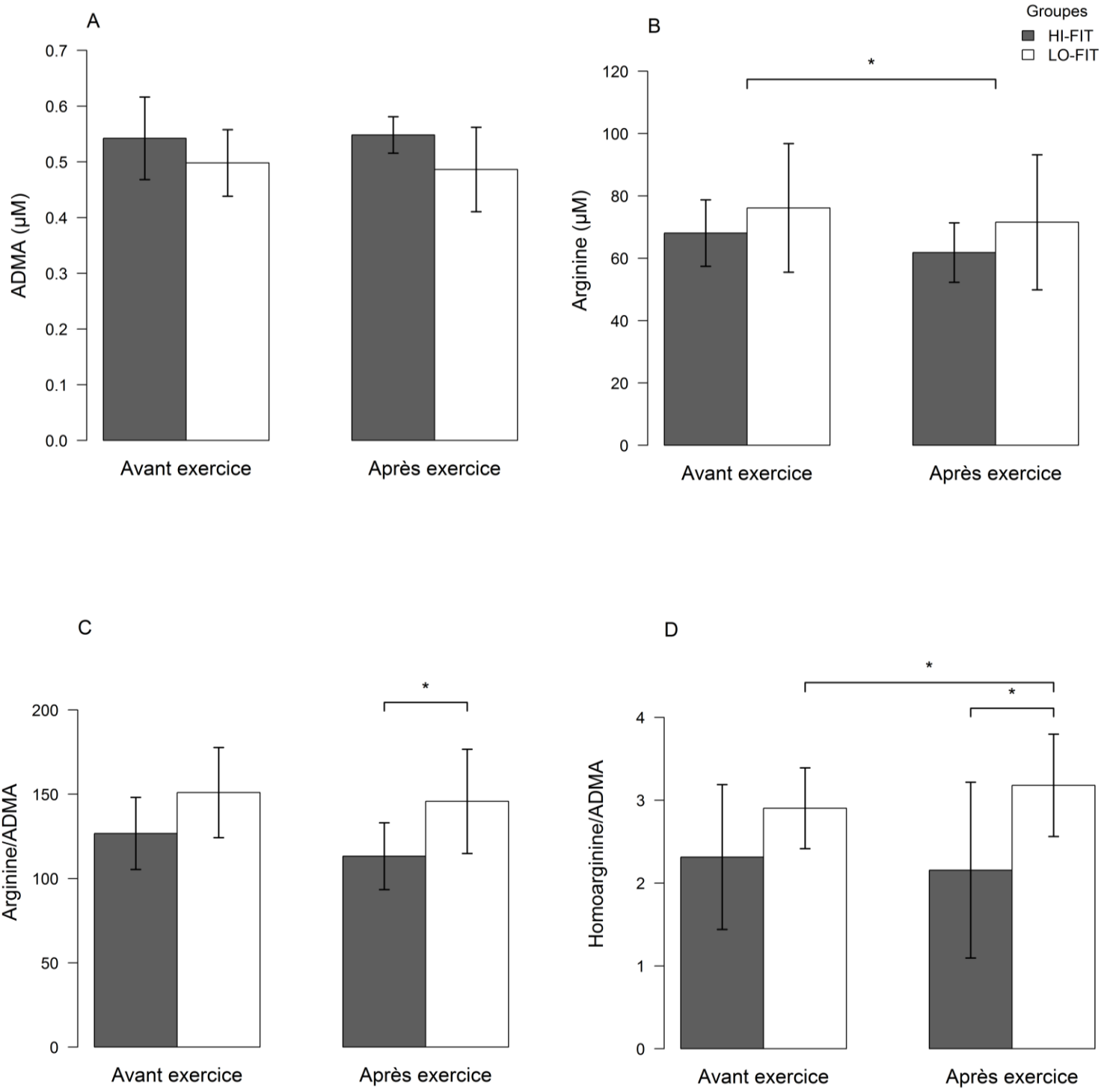
Aucun effet du groupe (HI-FIT ou LO-FIT) et du temps n'est observé sur les concentrations plasmatiques d'ADMA, malgré une tendance vers des concentrations ADMA plus élevées dans le groupe HI-FIT (p = 0,06). Les résultats relatifs à l'ADMA sont présentés dans la Figure 16, et les valeurs absolues sont rapportées dans le Tableau 7. Les concentrations plasmatiques d'ADMA ne sont pas significativement associées à la $\dot{V}O_{2max}$ ou aux paramètres dérivés de la modélisation de la désoxygénation musculaire, aussi bien avant qu'après l'exercice.

TABLEAU 7. Concentrations plasmatiques de l'ADMA et des dérivés de la L-arginine pour les groupes LO-FIT et HI-FIT avant et après l'épreuve d'effort maximal

	HI-FIT		**LO-FIT**		**ANOVA**
	Pré-exercise	Post-exercise	Pré-exercise	Post-exercise	Effets
ADMA (µM)	0,54 ± 0,07	0,55 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,49 ± 0,08	Groupe §
L-arginine (µM)	68,09 ± 10,65	61,84 ± 9,52	76,15 ± 20,62	71,55 ± 21,65	Temps *
Homoarginine (µM)	1,24 ± 0,42	1,17 ± 0,50	1,45 ± 0,31	1,56 ± 0,44	
SDMA (µM)	0,60 ± 0,10	0,60 ± 0,10	0,55 ± 0,09	0,58 ± 0,08	
Citrulline (µM)	32,24 ± 6,77	32,05 ± 8,84	39,47 ± 9,19	39,38 ± 10,92	
L-arginine/ADMA	126,76 ± 21,34	113,25 ± 19,85	151,03 ± 26,74	145,78 ± 30,92	Groupe * Temps *
Homoarginine/ADMA	2,31 ± 0,87	2,16 ± 1,06	2,90 ± 0,49	3,18 ± 0,62	Groupe * Temps * Interaction *

Valeurs sont en moyenne ± ET. ADMA : Diméthylarginine asymétrique ; SDMA : Diméthylarginine symétrique. * : p < 0,05 ; § : p < 0,10 pour les tendances.

FIGURE 16. Concentrations plasmatiques de l'ADMA (Figure A), de la L-arginine (Figure B) et des rations de dérivés de la L-arginine, Arginine/ADMA (Figure C) et Homoarginine/ADMA (Figure D), pour les groupes LO-FIT (barres blanches) et HI-FIT (barres grises) avant et après l'épreuve d'effort maximal. * : $p < 0,05$.



3.2. Concentrations plasmatiques des dérivés et des rapports de la L-arginine

Les concentrations plasmatiques de la L-arginine sont diminuées après l'exercice comparativement à celles mesurées avant l'exercice ($p < 0,05$, Figure 16). Une corrélation significative est trouvée entre la $\dot{V}O_{2max}$ et les concentrations plasmatiques de citrulline pré-exercice ($r = -0,46$, $p < 0,05$) et de Homoarginine post-exercice ($r = -0,48$, $p < 0,05$). Les résultats concernant la concentration plasmatique de SDMA, de Homoarginine et de citrulline sont montrés dans les Figures 16 et 17.

Concernant les valeurs après l'exercice, les rapports L-arginine/ADMA ($p < 0,05$, Figure 16) et Homoarginine/ADMA ($p < 0,05$, Figure 16) sont significativement supérieurs chez le groupe LO-FIT comparativement à ceux mesurés chez le groupe HI-FIT. Le rapport Homoarginine/ADMA augmente après l'exercice comparativement à son niveau avant l'exercice dans le groupe LO-FIT, uniquement ($p < 0,05$, Figure 16). Les valeurs absolues des concentrations plasmatiques des dérivés de la L-arginine et des rapports sont présentées dans le Tableau 7.

Le rapport L-arginine/ADMA est corrélé au $\dot{V}O_{2max}$ aussi bien avant qu'après l'exercice ($r = -0,47$, $p < 0,05$; $r = -0,58$, $p < 0,01$, respectivement). Le rapport Homoarginine/ADMA est négativement corrélé au $\dot{V}O_{2max}$ après l'exercice ($r = -0,58$, $p < 0,01$), mais cette association n'apparait pas pour les variables avant l'exercice. Toutes les corrélations entre les concentrations plasmatiques des dérivés de la L-arginine et le $\dot{V}O_{2max}$ sont rapportées dans le Tableau 8.

3.3. Désoxygénation musculaire

La pente du modèle sigmoïde (d) et le point c/d, correspond à 50 % de l'amplitude totale de la réponse Δ[HHb], ne diffèrent pas significativement entre les groupes HI-FIT et LO-FIT. Aucune association n'est observée entre les concentrations plasmatiques des dérivés de la L-arginine et les paramètres issus de la modélisation de la désoxygénation musculaire au cours de l'exercice (Cf. Tableau 8). Les paramètres estimés à partir de la modélisation de la réponse de Δ[HHb] au cours de l'épreuve d'effort maximal sont présentés dans le Tableau 9.

FIGURE 17. Concentrations plasmatiques de la SDMA (Figure A), de la Homoarginine (Figure B) et de la Citrulline (Figure C) pour les groupes LO-FIT (barres blanches) et HI-FIT (barres grises) avant et après l'épreuve d'effort maximal.

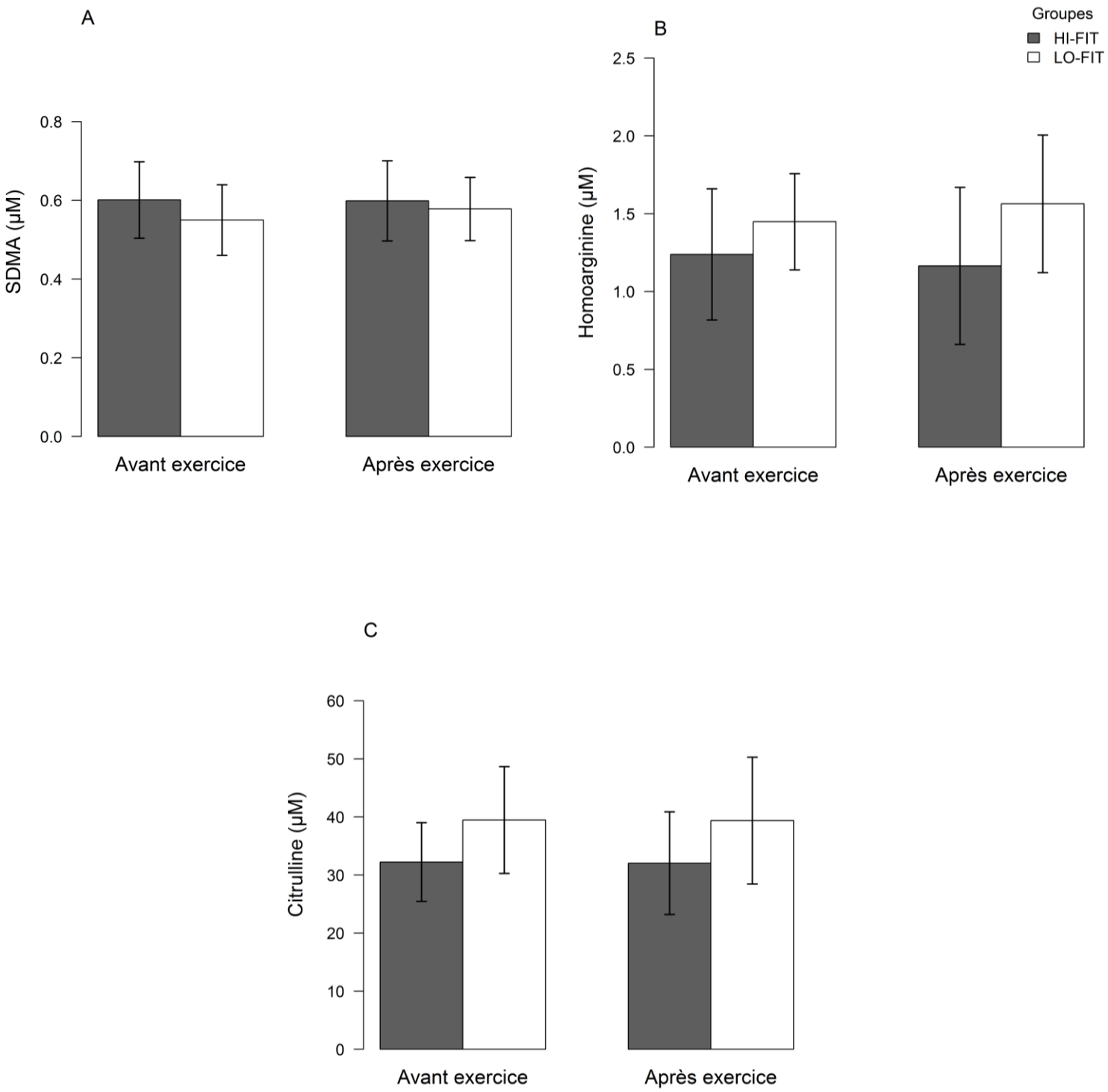


TABLEAU 8. Associations des concentrations plasmatiques de l'ADMA et des dérivés de la L-arginine avec le $\dot{V}O_{2max}$ et les paramètres estimés à partir de la modélisation sigmoïde de la désoxygénation musculaire

	PRE-EXERCISE			**POST-EXERCISE**		
	$\dot{V}O_{2max}$	*d* #	*c/d* #	$\dot{V}O_{2max}$	*d* #	*c/d* #
ADMA (µM)	0,30	- 0,18	- 0,02	0,33	- 0,08	- 0,13
L-arginine (µM)	- 0,27	0,15	0,21	- 0,40	0,05	0,05
Homoarginine (µM)	- 0,32	0,06	0,03	- 0,48 *	0,10	- 0,16
SDMA (µM)	0,33	- 0,26	- 0,12	0,14	- 0,12	- 0,11
Citrulline (µM)	- 0,46 *	- 0,16	- 0,09	- 0,44	- 0,20	0,01
L-arginine/ADMA	- 0,47 *	0,19	0,24	- 0,58 *	- 0,04	0,17
Homoarginine/ADMA	- 0,43	- 0,03	0,19	- 0,56 *	0,05	- 0,05

: Associations estimées par le rho de Spearman. ADMA : Diméthylarginine Asymétrique ; SDMA : Diméthylarginine Symétrique ; *d* : la pente du modèle sigmoïde ; *c/d* : la valeur de x correspond à 50 % de l'amplitude totale. * : $p < 0,05$.

TABLEAU 9. Paramètres de l'ajustement de la modélisation et variables dérivées du modèle sigmoïde de la désoxygénation musculaire mesurée au cours de l'épreuve d'effort maximal

	Groupes	
	HI-FIT	LO-FIT
Variables estimées		
f_0	- 10,7 (19,7 - (-) 49,1)	- 26,8 (13,8 - (-) 33,8)
A	143,8 (180,0 - 86,8)	137,6 (158,3 - 98,4)
c	4,6 (11,4 - 2,7)	4,6 (7,2 - 2,8)
d	0,09 (0,18 - 0,05)	0,08 (0,13 - 0,06)
c/d	60,3 (69,9 - 47,7)	51,6 (69,3 - 50,3)
Projection du pic de la réponse	117,2 (132,7 - 106,5)	113,3 (115,3 - 109,1)
Ajustement		
RSS	3471,6 (4863,3 - 1356,9)	3446,1 (6107, 5 - 2538,8)
R^2	0,97 (0,99 - 0,90)	0,98 (0,99 - 0,96)
SEE	5,9 (7,0 - 3,7)	5,9 (7,8 - 5,0)

Valeurs présentées en médiane et écart interquartile ($75^{th} - 25^{th}$). f_0 : le % $\Delta[HHb]_{max}$ au repos ; A : l'amplitude du % de la réponse du $\Delta[HHb]$; c : la constante liée à d ; d : la pente du modèle sigmoïde ; c/d : la valeur de x correspond à 50 % de l'amplitude totale ; Projection du pic de la réponse : somme de $f_0 + A$; RSS : la somme résiduelle des moindres carrés ; R^2 : coefficient de détermination ; SEE : l'estimation de l'erreur standard.

4. Discussion

Dans notre étude 3, les objectifs étaient de déterminer 1) si les concentrations plasmatiques d'ADMA sont associées au niveau d'aptitude aérobie chez des sujets jeunes et sains, et 2) si les différences de cinétiques de désoxygénation musculaire sont associées aux concentrations plasmatiques d'ADMA au cours de l'exercice.

Dans cette étude, nous n'observons pas de différence significative des concentrations plasmatiques d'ADMA entre le groupe d'athlètes entraînés en endurance (HI-FIT, $\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}) et le groupe constitué de sujets ayant une faible aptitude aérobie (LO-FIT, $\dot{V}O_{2max}$ < 45 mL.min^{-1}.kg^{-1}). Ces résultats divergent avec les travaux déjà menés dans la littérature scientifique, dans lesquels l'ADMA plasmatique est négativement liée à l'aptitude aérobie chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque (Seljeflot et al. 2011), d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Wilson et al. 2010), et chez des sujets présentant des risques cardiovasculaires (Deftereos et al. 2014; Tanahashi et al. 2014b). Ainsi, l'ADMA semble être impliquée dans la régulation de la perfusion musculaire et de l'apport en O_2 dans des populations, où la fonction vasculaire et l'aptitude aérobie sont altérées. Dans notre étude, alors même que le groupe HI-FIT présentant un $\dot{V}O_{2max}$ supérieur de 60 % à celui mesuré dans le groupe LO-FIT, l'absence de différence dans les concentrations plasmatiques d'ADMA entre les groupes suggère que l'ADMA n'est pas un facteur indépendant, pouvant influencer l'utilisation et l'apport de l'O_2 au cours de l'exercice.

En outre, l'ADMA n'est pas associée au profil de la désoxygénation musculaire au cours de l'exercice chez des sujets jeunes et sains. Une augmentation de l'extraction en O_2 peut partiellement compenser une réduction du débit sanguin musculaire lors de l'exercice (DeLorey 2005). Ainsi, Ferreira et al. (2007) ont proposé que la modélisation de la désoxygénation musculaire en fonction du pourcentage de $\dot{V}O_{2max}$, au cours d'une épreuve d'effort maximal, serait un outil permettant d'évaluer la fonction vasculaire au niveau microvasculaire. Nous pouvons supposer que, dans le cas d'une réduction de la fonction endothéliale induite par l'ADMA au niveau microvasculaire, le profil de la désoxygénation musculaire pourrait être décalé vers la gauche. Ceci signifierait que l'atteinte des 50 % de l'amplitude totale de la désoxygénation musculaire serait plus précoce à un plus faible pourcentage de $\dot{V}O_{2max}$. Une élévation pharmacologique de la concentration plasmatique d'ADMA, à des niveaux observés

dans des conditions pathologiques (Bode-Böger et al. 2007), conduit à une augmentation des résistances vasculaires et à une altération du débit cardiaque en réponse à l'exercice (Achan et al. 2003). Dans cette étude, les concentrations plasmatiques d'ADMA sont dans les normes attendues (0,29 à 0,63 µmol/L) pour des sujets sains (Blackwell et al. 2007). Des variations de concentrations plasmatiques d'ADMA dans cet intervalle ne semblent donc pas affecter l'apport et l'utilisation de l'O_2 au niveau musculaire.

Néanmoins, contrairement à nos résultats, une étude rapporte un décalage vers la droite du profil de la désoxygénation musculaire chez des cyclistes lors d'une épreuve d'effort maximal, par rapport à des sujets actifs (Boone et al. 2009). Ce décalage du profil de la désoxygénation musculaire est corrélé à l'aptitude aérobie des individus (Boone et al. 2009). Dans notre étude, l'absence de décalage vers la droite chez les sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé peut s'expliquer par un recrutement plus précoce des fibres de type 2 dans le groupe HI-FIT, en raison d'une charge initiale nettement supérieure à celle du groupe LO-FIT (Krustrup et al. 2004). Les fibres de type 2 se caractérisent par une extraction en O_2 plus importante à une activité métabolique oxydative donnée (Behnke et al. 2003), et par un déséquilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 comparativement aux fibres de type 1 (McDonough et al. 2005). Ces caractéristiques peuvent être aussi le reflet d'une sensibilité moindre des fibres de type 2 à la vasodilatation dépendante du NO (Woodman et al. 2001). Ainsi, un recrutement précoce des fibres de type 2 pourrait masquer les différences au niveau de la fonction microvasculaire entre les 2 groupes (HI-FIT versus LO-FIT), et empêcher toute association avec la concentration plasmatique d'ADMA.

Par ailleurs, dans notre étude, nous observons également d'autres résultats inattendus. Le groupe HI-FIT présente des faibles rapports L-arginine/ADMA et Homoarginine/ADMA après l'épreuve d'effort maximal par comparaison au groupe LO-FIT. Ce dernier groupe présente même une augmentation du rapport Homoarginine/ADMA à la suite de l'épreuve d'effort maximal. Le rapport Homoarginine/ADMA a été proposé comme un nouveau marqueur dans la détermination des risques cardiovasculaires (Tsikas et Kayacelebi 2014), puisque la Homoarginine peut être utilisée comme substrat par la NO synthase, en lieu et place du précurseur traditionnel, la L-arginine (Pilz et al. 2015). Toutefois, malgré des rapports supérieurs chez le groupe LO-FIT, les valeurs du rapport L-arginine/ADMA sont dans les normes attendues (de 54,3 à 227) pour des sujets sains (Bode-Böger et al. 2007). Un équilibre non perturbé entre la L-arginine et l'ADMA, tous deux substrat et inhibiteur respectivement de

la synthèse du NO, pourrait expliquer l'absence de différence significative au niveau du profil de la désoxygénation musculaire, malgré la présence d'une large différence de $\dot{V}O_{2max}$ entre les 2 groupes. Cette hypothèse semble être soutenue par le manque d'élévation de la production du NO à la suite d'une supplémentation aigue de L-arginine par rapport au placebo, chez des sujets sains ayant des concentrations plasmatiques d'ADMA dans les normes (Alvares et al. 2012). A contrario, le rapport L-arginine/ADMA apparaît comme un facteur plus déterminant dans l'activité de la NOS que la concentration plasmatique d'ADMA seule, sous conditions pathologiques (Bode-Böger et al. 2007).

De plus, les concentrations plasmatiques des acides aminés, en tant que biomarqueurs de leur métabolisme, peuvent être difficiles à estimer en raison d'une part de différences importantes dans les niveaux intra- et extra-cellulaires des acides aminés, et d'autre part d'échanges inter-organes conséquents à l'échelle de l'organisme (Cynober 2002). La concentration intracellulaire d'ADMA est supposée être 10 fois supérieure à sa concentration plasmatique (Böger et al. 2000), mais une altération au niveau des transporteurs d'acides aminés cationiques (CATs), responsables du transport de l'ADMA et la L-arginine, pourrait induire une association inverse entre le milieu intra- et extra-cellulaire (Teerlink et al. 2009). Ainsi, les niveaux plasmatiques d'ADMA peuvent être affectés, d'une part par sa production via les PRMTs et l'hydrolyse des protéines, d'autre part par sa dégradation via les DDAH, et enfin par leur transport transmembranaire via les CATs. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les différences de rapports observés entre les groupes HI-FIT et LO-FIT. Premièrement, l'entraînement en endurance stimule le renouvellement des protéines au niveau musculaire (Gibala 2007). Une augmentation de la dégradation des protéines induite par l'entraînement en endurance pourrait élever le niveau intracellulaire d'ADMA, et stimuler ainsi sa sortie du milieu intra-cellulaire vers le plasma par trans-stimulation des CATs. Au cours du processus de trans-stimulation, l'entrée dans la cellule de la L-arginine peut être stimulée par une augmentation de la sortie d'ADMA du milieu intra-cellulaire (Teerlink et al. 2009). Deuxièmement, l'expression et/ou l'activité des CATs pourraient être altérées par l'entraînement en endurance (Shan et al. 2013), contribuant ainsi aux différences dans les échanges intra- et extra-cellulaires des analogues de la L-arginine observées entre les 2 groupes (HI-FIT et LO-FIT). Troisièmement, le rapport Homoarginine/ADMA supérieur chez le groupe LO-FIT, à travers l'élévation de la Homoarginine, peut contribuer à réduire le niveau plasmatique d'ADMA par l'inhibition de sa formation via les PRMTs, et à préserver la L-arginine de sa dégradation en inhibant l'arginase (Michel 2013).

ETUDE 4 :

La diméthylarginine asymétrique n'affecte pas le débit sanguin musculaire lors de l'exercice chez le rat

1. Introduction

Comme précédemment mentionné, le NO est un puissant agent vasodilatateur qui contribue à la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Cooke 2004). Au cours de l'exercice, le NO est synthétisé par l'isoforme endothéliale de la NOS, laquelle est stimulée par les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur les parois vasculaires (Gao 2010). Le NO est également produit au sein du muscle par l'isoforme neuronale de la NOS, dont l'activité est stimulée par une augmentation du niveau calcique musculaire (Nakane et al. 1993). L'inhibition de la synthèse du NO altère le débit sanguin au niveau du membre inférieur ainsi que le recrutement microvasculaire (Vincent et al. 2003). Cette réduction de la perfusion musculaire est accompagnée d'une réduction de la captation du glucose de 40 % en réponse à l'insuline (Vincent et al. 2003). Par ailleurs, l'insuline au niveau musculaire diminue le gradient de concentrations du glucose au travers du sarcolemme, ce qui entraîne des changements dans la régulation de la captation du glucose (Wasserman et al. 2011). L'apport et la phosphorylation du glucose deviennent alors les deux facteurs limitants de la captation musculaire du glucose lors de la stimulation par l'insuline (Halseth et al. 1998). En outre, la sensibilité à l'insuline est négativement corrélée à la concentration plasmatique d'ADMA chez des sujets non diabétiques (Stühlinger et al. 2002). L'ADMA, par son action inhibitrice de la vasodilatation dépendante du NO (Achan et al. 2003), pourrait contribuer aux altérations du profil métabolique et de la sensibilité à l'insuline dans les populations présentant des troubles métaboliques (Sydow et al. 2005; Bakker et al. 2009; Womack et al. 2009).

À l'exercice, le facteur limitant la captation musculaire du glucose semble être principalement la phosphorylation du glucose chez des rats conscients et sains (Halseth et al. 1998). Cependant, la captation musculaire du glucose est le produit du débit sanguin et de la différence artérioveineuse de concentrations du glucose (Richter et Hargreaves 2013). Le débit sanguin au niveau des muscles squelettiques augmente de 20 fois au cours de la transition du repos à l'exercice (Andersen et Saltin 1985), tandis que la différence artérioveineuse de concentrations du glucose croît seulement de 2 à 4 fois lors de l'exercice (Rose et Richter 2005). Ainsi, l'augmentation du débit sanguin en réponse à l'exercice peut contribuer largement à l'élévation de la captation musculaire du glucose, et peut représenter ≈ 30 % de la captation totale du glucose aux muscles squelettiques à l'exercice (Zinker et al. 1993). Une réduction partielle et totale de l'expression de la eNOS ainsi qu'une inhibition pharmacologique de la synthèse du NO ont pour conséquence de diminuer l'apport de glucose aux muscles actifs, par

l'intermédiaire d'une réduction du débit sanguin en réponse à la contraction musculaire (Ross et al. 2007; Lee-Young et al. 2010). Les concentrations plasmatiques d'ADMA sont élevées dans des populations atteintes de pathologies métaboliques telles que le diabète de type 2 et le syndrome métabolique, comparativement aux sujets sains (Palomo et al. 2011; Sciacqua et al. 2012). Chez des patients avec un diabète de type 2, un haut niveau plasmatique d'ADMA prédit l'incidence des complications micro- et macro-vasculaires, indépendamment des facteurs de risque traditionnels (Ganz et al. 2017). De plus, les sujets atteints de diabète de type 2 présentent une altération de la réponse du débit sanguin au niveau de la jambe au cours d'un exercice d'intensité modérée sur bicyclette, par rapport à des sujets sains (Kingwell et al. 2002). À ce jour, aucune étude n'a montré ni une réduction de la perfusion musculaire dépendante du NO, ni une diminution de la captation musculaire du glucose à l'exercice, en raison d'une élévation du niveau plasmatique d'ADMA comme observée dans des conditions pathologiques.

L'objectif premier de cette étude est de déterminer si la perfusion d'ADMA chez le rat sain réduit la perfusion musculaire dépendante du NO et la captation musculaire du glucose au cours d'un exercice sur tapis roulant. L'objectif secondaire est d'établir si l'ADMA est un inhibiteur fonctionnel et sélectif de l'une des 2 isoformes (eNOS et nNOS) présentes dans le muscle squelettique en condition d'exercice.

2. Méthodes

2.1 Animaux

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en utilisant des rats Wistar Han, males *(Charles River, France)* à l'âge de 12±1 semaines au moment de l'exercice sur tapis roulant. Les rats étaient maintenus dans des cages ventilées selon des conditions respectant le statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique), et étaient disposés au maximum 2 par cage. Les conditions d'hébergement comprenaient entre autres, une température et un taux d'humidité contrôlés, un cycle jour/nuit de 12 h (*de 8h à 20h)*, et un accès non limité à la nourriture et à l'eau. Toutes les expérimentations ont été effectuées en accord avec les recommandations concernant l'expérimentation animale de la Directive Européenne 86/609-2010/63/UE. Le protocole a été validé par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale sous l'autorité du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche *(Nord – Pas de Calais, C2EA – 75)*.

2.2 Procédures à l'exercice

Préalablement à l'expérimentation à l'exercice, une phase de familiarisation à la course sur tapis roulant a été effectuée pendant 1 semaine, au cours de laquelle la vitesse et le temps de course ont été progressivement augmentés afin atteindre les mêmes modalités d'exercice, utilisées le jour de l'expérimentation. Au moment de l'expérimentation à l'exercice, les rats étaient placés sur le tapis roulant, et les cathéters introduits au niveau de la carotide et de la jugulaire étaient connectés au dispositif de perfusion et de prélèvement. Une période de 30 min d'acclimatation était laissée aux rats afin de minimiser le stress avant le début de la course sur le tapis roulant. La perfusion du traitement, lequel dépendait du groupe de rattachement de l'animal, commençait 30 min avant l'exercice au taux de perfusion de 0,5 $mL.h^{-1}$ grâce au cathéter jugulaire. Les groupes ont été répartis de la façon suivante : groupe 1, perfusion d'ADMA *($60mg.kg^{-1}.h^{-1}$)* ; groupe 2, perfusion d'ADMA + STMC, un inhibiteur spécifique de la nNOS *(SMTC : 0,56 $mg.kg.h^{-1}$)* ; et groupe 3, perfusion d'une solution de 0,9 % de chlorure de sodium. Les doses perfusées d'ADMA et de SMTC ont été fixées en fonction de précédents travaux montrant une augmentation significative de la tension artérielle liée à la

vasoconstriction périphérique, et une diminution significative de la perfusion musculaire lors de l'exercice, respectivement (Augustyniak et al. 2006; Copp et al. 2010c).

Une injection de 2-NBDG était réalisée via le cathéter veineux 1 min avant le début de la course sur le tapis roulant. L'exercice était réalisé à une vitesse de 20 $m.min^{-1}$ et à une pente de 5 %, et durait 20 min. La vitesse cible était atteinte dans les 3 min après le début de la course sur le tapis roulant. Les modalités d'exercice avaient été précédemment utilisées dans le cadre d'une étude investiguant la captation musculaire du glucose à l'exercice, chez des rats habitués à la course, mais non entraînés (Halseth et al. 1998). Les modalités de course lors de l'exercice sur tapis roulant étaient susceptibles d'entraîner un $\dot{V}O_2$ inférieur à 55 % du $\dot{V}O_{2max}$ attendu chez des rats sains (Musch et al. 1988). Des prélèvements sanguins étaient effectués avant et après l'exercice, mais également au cours de la course afin de mesurer la disparition du 2-NBDG dans le plasma. Une injection de microsphères fluorescentes était réalisée via le cathéter carotidien, 1 min avant la fin de la course sur le tapis roulant pour estimer le débit sanguin musculaire à la fin de l'exercice. Immédiatement à l'issue de l'exercice, les animaux étaient mis à mort afin d'effectuer les prélèvements tissulaires.

2.3 Procédure chirurgicale

La procédure chirurgicale a consisté à isoler l'artère carotidienne gauche et la veine jugulaire droite afin d'insérer un cathéter chronique pour limiter le stress de l'animal lors des prélèvements et des perfusions au cours de l'exercice. L'artère carotidienne gauche et la veine jugulaire droite étaient cathétérisées afin d'effectuer des prélèvements et des perfusions, respectivement, au cours de l'exercice. La procédure chirurgicale relative à l'implantation chronique des cathéters a été basée sur une méthode déjà précédemment décrite (Hughey et al. 2011). La chirurgie était réalisée en condition aseptique, et tous les instruments étaient stérilisés au préalable. Les rats étaient anesthésiés par un gaz halogène, l'isoflurane (*induction : 3 % à un débit de 1 L d'O_2, maintien : 1-2 % à un débit de 0,4 L d'O_2)*, pendant toute la durée de la procédure chirurgicale. Une incision était réalisée au niveau de la ligne ventrale et médiane du cou, avec une taille d'ouverture comprise entre 1 et 2 cm. Après la dissection non traumatique des tissus supérieurs, le muscle sterno-cléido-mastoïdien était exposé afin de repérer l'emplacement de la carotide. L'artère carotidienne était ensuite isolée du tissu conjonctif, et était séparée du nerf vague, en veillant à ne pas endommager ce dernier. La carotide était

ligaturée avec du fil de soie *(taille : 4-0)*, au niveau de la terminaison céphalique afin d'être manipulée. Une section était effectuée dans le plan frontal, et un introducteur de cathéter était introduit dans la lumière de la carotide. Une fois le cathéter en place *(longueur : ≈ 2,7 cm ; corps : tube de polyéthylène, Bioseb, France ; boursoufflure : tube de silicone, Harvard Apparatus, Etats-Unis)*, deux sutures avec du fil de soie *(taille : 4-0)* étaient réalisées l'une au niveau de la terminaison caudale, et l'autre à la hauteur de la boursoufflure du cathéter. La même procédure était exécutée pour la pose du cathéter *(longueur : ≈ 3,2 cm ; mêmes composants que le cathéter artérielle)* au niveau de la veine jugulaire droite. Les cathéters étaient rincés avec une solution de 0,9 % de chlorure de sodium, héparinée *(150 U/mL)* pour éviter toute coagulation. Les cathéters étaient scellés avec un embout en acier inoxydable *(Harvard Apparatus, Etats-Unis)*, et étaient ensuite guidés sous la peau à l'aide d'une aiguille *(14 G, inox, Dutscher, France)* vers la face dorsale du cou. Les cathéters étaient extériorisés, puis maintenus en place à l'aide d'un tube TYGON *(Harvard Apparatus, Etats-Unis)*, et l'ensemble était fixé avec de la colle ultra-forte. À la suite de la chirurgie, les animaux séjournaient dans une cage individuelle, et suivaient un contrôle sanitaire quotidien. Au cours du suivi de chaque animal, la masse corporelle était relevée, et les cathéters étaient rincés avec une solution de 0,9 % de chlorure de sodium, héparinée *(150 U/mL)*. Une période de récupération était laissée aux rats avant la réalisation de l'exercice sur tapis roulant *(≈ 5 jours)*.

2.4 Détermination du débit sanguin régional

Le débit sanguin régional était déterminé comme le pourcentage de débit cardiaque distribué aux tissus cardiaque, rénal et musculaire, et a été basé selon une méthode précédemment décrite (Maxwell et al. 1998), avec quelques modifications apportées.

2.4.1 Injection des microsphères

La solution de 0,9 % chlorure de sodium contenant les microsphères *(0,5 x 10^6, diamètre : 15 µm, 0,5 mL de solution)* était homogénéisée à l'aide d'un vortex pendant 10 min. Les microsphères étaient injectées 1 min avant la fin de l'exercice sur tapis roulant, au niveau du cathéter carotidien. L'injection était opérée de façon lente et constante, afin de permettre une

dissolution uniforme des microsphères dans le sang. À la fin de l'injection, l'espace mort du cathéter était rincé avec une solution de 0,9 % chlorure de sodium, héparinée *(10 U/mL)*.

2.4.2 Analyse des microsphères

Les tissus cardiaque, rénal et musculaire ainsi que le prélèvement de référence (correspondant à 100 % du débit sanguin) étaient digérés dans une solution de 1M KOH à 60°C, et étaient laissés en incubation toute une nuit à 60°C. Les échantillons étaient ensuite mélangés à l'aide d'un vortex pendant 45-1h, et enfin étaient centrifugés à 5000 g pendant 10 min. Le surnageant était retiré jusqu'au niveau du tissu. Le dépôt tissulaire était resuspendu dans de l'eau pure *(Milli-Q, Water Purification, Merck)* avec 0,5 % de Tween80 *(Sigma Aldrich)*, puis était centrifugé à nouveau *(5000 g, 10 min)*. Cette opération était réalisée à 2 reprises, et le surnageant était retiré à chaque fois. Le dépôt tissulaire était ensuite resuspendu dans une solution d'éthanol, centrifugé *(5000 g, 10 min)*, et le surnageant était retiré. Une faible quantité d'éthanol était laissée sur le dépôt tissulaire, et l'ensemble était mis en incubation toute une nuit à température ambiante afin de faire évaporer l'éthanol. Le dépôt tissulaire restant était dissout dans 250 µL de 2-ethoxyéthylacétate *(Sigma Aldrich)* afin d'extraire le fluorophore des microsphères, contenues dans le tissu. La fluorescence des microsphères a été déterminée à partir des longueurs d'onde recommandées par le fabricant *(excitation 505 nm et émission 515 nm)*, et par le biais d'un système de spectroscopie de fluorescence *(SpectraMax M5e reader, Molecular devices, Etats-Unis)*.

2.4.3 Estimation du débit sanguin regional

La même quantité de microsphères injectée au niveau du cathéter carotidien était déposée dans un tube, qui servait de prélèvement de référence, correspondant à 100 % du débit sanguin (≈ débit cardiaque maximal). Le débit sanguin régional à la fin de l'exercice était calculé à partir de l'intensité de la fluorescence, et était exprimé comme le pourcentage de débit cardiaque maximal distribué au tissu (% COt) selon la formule suivante :

$$\%\mathrm{CO_{ti}} = \frac{f_{ti}\left(\frac{MT_{tmoyenne}}{MT_i}\right)}{f_{pr}}$$

Où f_{ti} représente l'intensité de la fluorescence du tissu étudié, issu du rat i ; $MT_{tmoyenne}$ est la masse moyenne du tissu analysé de l'ensemble des rats ; MT_i est la masse du tissu étudié du rat i ; f_{pr} correspond l'intensité de la fluorescence du prélèvement de référence.

Pour vérifier l'homogénéisation des microsphères dans la circulation sanguine, le débit sanguin distribué aux reins gauche et droit a été également estimé. Une différence de plus de 10 % entre les reins était le critère attestant d'une mauvaise homogénéisation des microsphères, et l'animal concerné était retiré de l'analyse.

2.5 Injection du 2-NBDG

Une solution de 0,9 % de chlorure de sodium était préparée avec une quantité dissoute de 2-NBDG, déterminée selon la masse corporelle de l'animal (1 mg/kg, Guo et al. 2014). Le mélange était homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 10 min. Le 2-NBDG était injecté immédiatement avant le début de l'exercice sur tapis roulant, au niveau du cathéter veineux. L'espace mort du cathéter était rincé avec une solution de 0,9 % chlorure de sodium, héparinée *(10 U/mL)*, après de l'injection de 2-NBDG.

2.6 Prélèvements tissulaires

Les prélèvements tissulaires étaient effectués juste après l'exercice, à la suite de la mise à mort de l'animal par une injection léthale de pentobarbital sodique *(180 mg.kg^{-1}, intra-artérielle)*. Les organes *(cœur, reins et foie)* et les muscles *(soleus, extensor digitorum longus, gastrocnemius rouge et blanc, tibialis rouge et blanc)* étaient identifiés et prélevés, puis placés dans de l'azote liquide et maintenus à - 80°C jusqu' à l'analyse biochimique. Les muscles prélevés ont été sélectionnés en fonction de leur typologie afin d'obtenir une large distribution dans la composition des fibres musculaires analysées. La proportion de fibres musculaires de type 2 dans les muscles choisis s'établit de la façon suivante (Delp et Duan 1996) : soleus 9 %,

EDL 76 %, gastrocnemius rouge 14 %, gastrocnemius blanc 100 %, tibialis rouge 63 %, tibialis blanc 80 %.

2.7 Analyse des données

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R (R version 3.2.5, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type. La normalité de la distribution et l'hétéroscédasticité des données étaient évaluées par un test de Shapiro-Wilk et un test de Levene, respectivement. Le pourcentage de distribution du débit cardiaque aux muscles squelettiques était analysé par une ANOVA à double voie, avec comme facteurs principaux le traitement *(ADMA, ADMA + SMTC, Saline)* et les muscles composés de fibres musculaires de différentes typologies : muscles composés majoritairement de fibres musculaires de type 1 *(Soleus, Gastrocnemius rouge et Tibialis rouge) et* muscles constitués principalement de fibres musculaires de type 2 *(EDL, Gastrocnemius blanc, Tibialis blanc)*. L'interaction entre ces deux facteurs était aussi évaluée. Une analyse post-hoc était ensuite réalisée avec une correction de Benjamini-Hochberg pour variables indépendantes, le cas échéant. Le seuil de significativité était fixé à $p < 0,05$.

En raison d'une ouverture tardive de notre animalerie EOPS et des délais importants imposés par les procédures spécifiques au marché public, les expérimentations chez l'animal n'ont pu être clôturées qu'à la toute fin du premier semestre 2017. Les analyses ont commencé à la fin de ce semestre. La captation du glucose à partir des prélèvements musculaires au cours de l'exercice n'a pu être déterminée dans les délais impartis pour la rédaction de cette Thèse. Je tiens tout de même à vous présenter la suite du protocole envisagé pour déterminer la captation musculaire du glucose. Les résultats issus de ces prochaines analyses seront mis en association avec les données de la perfusion musculaire à l'exercice.

2.8 Protocole envisagé pour la détermination de la captation du glucose

La captation du glucose régionale sera calculée selon la concentration de 2-NBDG s'accumulant dans les tissus, et exprimée en µg/g protéines. La fluorescence des tissus et la

concentration des protéines seront déterminées dans chaque tissu. Les concentrations de 2-NBDG seront calculées selon la courbe des standards de l'intensité de la fluorescence, déterminée à partir d'échantillons contenant une concentration de 2-NBDG contenue. La captation du glucose régionale sera estimée à l'aide d'un protocole précédemment décrit (Ye et al. 2008). La linéarité de l'intensité de la fluorescence (r = 0,99 pour le sang et le muscle, respectivement) concernant la courbe des standards, est maintenue lorsque la concentration de 2-NBDG dans les solvants est inférieure à 5,132 µg/mL (Ye et al. 2008).

Pour l'analyse du sang, le 2-NBDG sera dissout dans du sang non coagulé de rat à une concentration donnée *(intervalle des standards : de 50 à 250 mg/dL)*, et sera dilué dans 0,9 % de chlorure de sodium à un rapport de 1 : 6 *(mL : mL)*. Ce produit sera centrifugé à 3500 rotations par minute pendant 4 min. Les prélèvements musculaires seront homogénéisés dans 0,9 % de chlorure de sodium à un rapport de 1 : 10 *(g : mL)*. Ensuite, une concentration donnée de 2-NBDG *(intervalle des standards : de 0,64 à 5,12 µg/mL)* sera ajoutée et dissoute dans le tissu musculaire précédemment homogénéisé. Ce produit sera centrifugé à 5000 rotations par minute pendant 10 min. Des prélèvements musculaires et sanguins seront préparés de façon similaire, mais sans l'ajout de 2-NBDG, et serviront de « blanc » afin de retirer la fluorescence de fond. Après la centrifugation des prélèvements, 100 µL des surnageants seront retirés afin de déterminer l'absorbance de la fluorescence issue du 2-NBDG, selon les longueurs d'onde recommandées par le fabricant *(excitation 465 nm et émission 540 nm)*. La même quantité des surnageants sera également utilisée pour estimer la concentration des protéines dans les prélèvements tissulaires par le biais de la colorimétrie *(Pierce BCA protrein Assay Kit, Thermo Scientific, Etats-Unis)*.

3. Résultats

3.1 Perfusion musculaire à l'exercice

Trente rats ont été inclus dans le protocole au cours de cette étude, seuls 16 rats ont donné des résultats exploitables dans l'estimation de la perfusion musculaire, avec la répartition suivante : 6 rats sous ADMA, 5 rats sous ADMA + SMTC, 5 rats sous solution saline. Au final, 94 muscles issus de ces rats ont été pris en compte dans la détermination de la perfusion musculaire à l'exercice.

Aucune différence significative n'a été observée au niveau de la perfusion musculaire des muscles prélevés entre les divers traitements utilisés au cours de cette étude : ADMA, ADMA + SMTC, Saline. Les résultats sont présentés dans les Figures 18 et 19. La typologie musculaire n'affecte pas les effets de l'ADMA sur la perfusion musculaire au cours de l'exercice (Cf. Tableau 10).

3.2 Captation musculaire du glucose à l'exercice

La méthode de traitement des échantillons tissulaires ainsi que le protocole d'analyse de la captation du glucose ont fait, tous deux, l'objet de phases de mise au point. Nous avons seulement obtenu des résultats sur des échantillons tests concernant la captation tissulaire du glucose (foie, reins droit et gauche). De ce fait, les résultats pour la captation du glucose ne sont pas présentés dans cette thèse, mais les analyses seront poursuivies ultérieurement afin de déterminer les niveaux de captation musculaire du glucose selon les conditions de traitement infusé aux rats (ADMA, ADMA + SMTC, saline).

FIGURE 18. Perfusion musculaire à la fin de l'exercice dans les muscles ayant une prédominance de fibres musculaires de type 1 suivant les trois conditions de traitement (ADMA, ADMA + SMTC, et Saline).

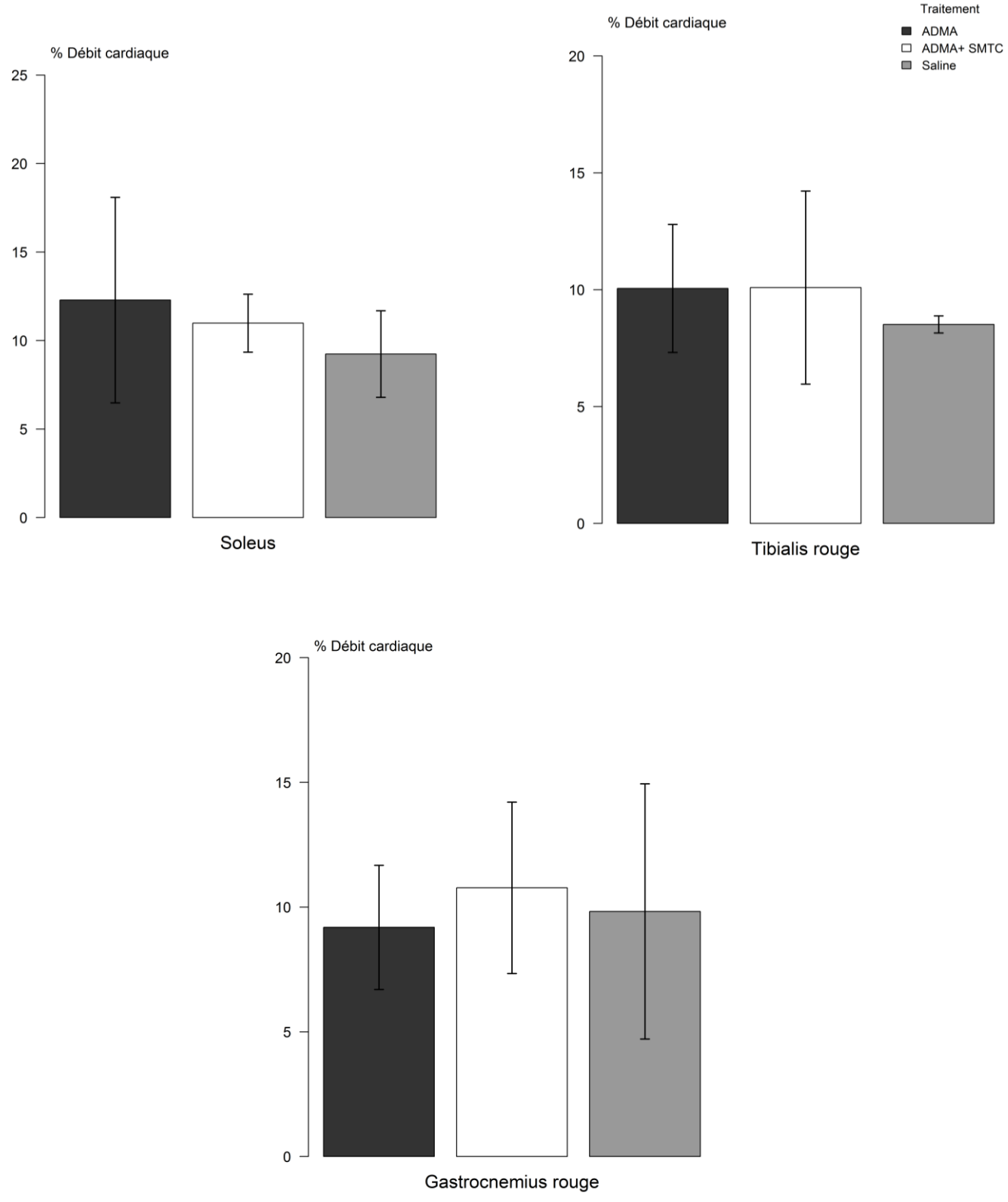


FIGURE 19. Perfusion musculaire à la fin de l'exercice les muscles ayant une prédominance de fibres musculaires de type 2 suivant les trois conditions de traitement (ADMA, ADMA + SMTC, et Saline).

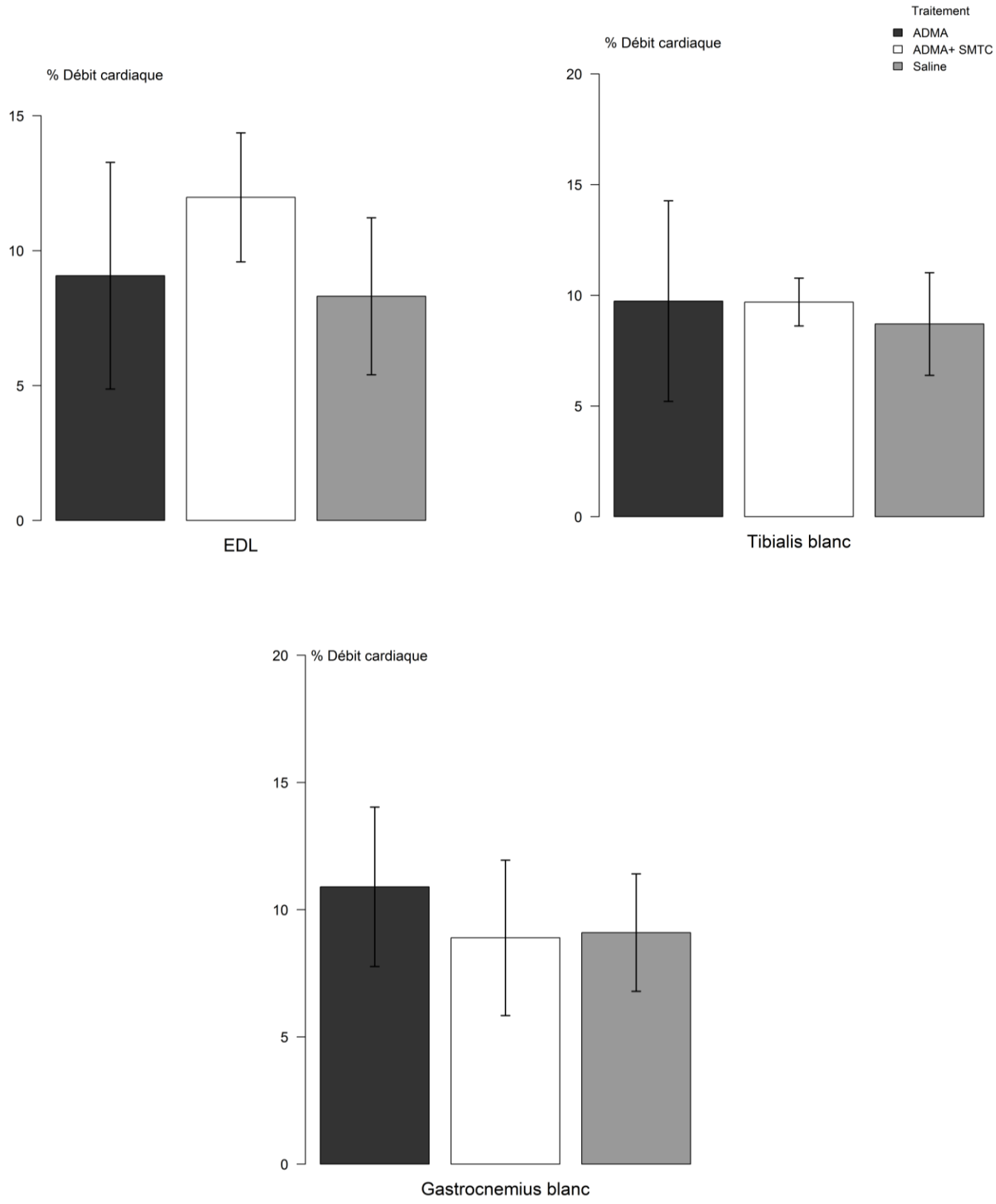


TABLEAU 10. Perfusion musculaire à la fin de l'exercice mesurée au niveau des muscles des membres postérieurs chez des rats ayant suivi les 3 conditions expérimentales (ADMA, ADMA + SMTC, Saline)

	Traitements			
	ADMA	ADMA+SMTC	Saline	Valeur du p
Muscles		% CO		
EDL *(76 %)*	9,1 ± 4,2	12,0 ± 2,4	8,3 ± 2,9	0,22
Soleus *(9 %)*	12,3 ± 5,8	11,0 ± 1,6	9,2 ± 2,5	0,47
Gastrocnemius rouge *(14 %)*	9,2 ± 2,5	10,8 ± 3,4	9,8 ± 5,1	0,79
Gastrocnemius blanc *(100 %)*	10,9 ± 3,1	8,9 ± 3,1	9,1 ± 2,3	0,50
Tibialis rouge *(63 %)*	10,1 ± 2,7	10,0 ± 4,1	8,5 ± 0,4	0,62
Tibialis blanc *(80 %)*	9,7 ± 4,5	9,7 ± 1,1	8,7 ± 2,3	0,84

EDL : extensor digitorum longus muscle ; % CO : perfusion musculaire exprimée en pourcentage du débit cardiaque. Entre parenthèses la proportion de fibres musculaires de type 2 selon Delp et Duan (1996).

4. Discussion

Dans notre étude 4, les objectifs étaient de déterminer 1) si la perfusion d'ADMA réduit la perfusion musculaire dépendante du NO au cours d'un exercice sur tapis roulant chez le rat sain, et 2) si l'ADMA est un inhibiteur spécifique de l'une des 2 isoformes de la NOS (eNOS et nNOS) présentes dans le muscle squelettique en condition d'exercice.

Dans cette étude, nous n'avons observé aucun effet de l'ADMA sur la perfusion musculaire au cours d'un exercice sur tapis roulant chez le rat. À notre connaissance, cette étude est la première à explorer l'effet de l'ADMA sur la perfusion musculaire au cours d'un exercice « corps entier ». Chez l'homme sain, lorsque les concentrations plasmatiques d'ADMA sont augmentées de manière pharmacologique pour atteindre des niveaux correspondant de 4 à 9 fois à ceux observés chez les sujets sains, il se produit une augmentation des résistances vasculaires systémiques qui pourraient être liées à une altération de la vasodilatation périphérique (Achan et al. 2003). De plus, les effets de l'ADMA sont plus marqués en réponse à l'exercice. En effet, les sujets contrôles présentent une augmentation du débit cardiaque de 97 % en réponse à l'exercice de type « handgrip », alors que les sujets sous perfusion d'ADMA ont une augmentation du débit cardiaque de seulement 35 % (Achan et al. 2003). Ces résultats ont été confirmés au préalable avec une diminution dose dépendante du débit sanguin au niveau de l'avant-bras après la perfusion d'ADMA chez des sujets sains (Vallance et al. 1992). Les divergences entre les résultats de notre étude et ceux précédemment décrits pourraient s'expliquer d'une part par les modalités d'exercice utilisées - lesquelles entraînent des différences dans la réponse vasodilatatrice à l'exercice et dans les fibres musculaires recrutées - et d'autre part par les espèces étudiées (homme ou animal).

Des études chez des animaux anesthésiés ne rapportent pas de changement au niveau du débit sanguin musculaire en présence d'un inhibiteur pharmacologique de la NOS, lors d'une contraction musculaire stimulée ou d'augmentation de l'activité métabolique (Saito et al. 1994; King-Vanvlack et al. 1995). En outre, Copp et al. (2010a) explorent l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de la NOS sur le débit sanguin et la conductance vasculaire lors d'un exercice de course d'intensité modérée chez des rats. Le débit sanguin et la conductance vasculaire aux muscles des membres postérieurs sont alors réduits après l'inhibition de la NOS au cours de l'exercice (Copp et al. 2010a). Dans la présente étude, à l'opposé des résultats précédents, nous n'observons pas de diminution du débit sanguin au niveau des muscles des membres postérieurs

au cours de l'exercice de course d'intensité modérée après la perfusion d'ADMA. Les observations contradictoires entre ces deux dernières études pourraient s'expliquer par le moment choisi pour débuter la perfusion de l'inhibiteur de la NOS. Dans le cadre de notre étude, nous avions opté pour un début de la perfusion des traitements ADMA et ADMA + SMTC 30 min avant l'exercice, afin de simuler une diminution chronique de la biodisponibilité du NO similaire à celle rencontrée dans des conditions de pathologies chroniques. Le début de la perfusion d'inhibiteurs de la NOS avant l'exercice peut masquer la contribution du NO dans l'hyperémie à l'exercice, en réduisant le débit sanguin de repos. En effet, l'inhibition de la NOS cause une diminution de 50 % du débit sanguin basal au niveau de l'avant-bras chez des sujets sains (Vallance et al. 1989). De plus, au cours d'un exercice de type « handgrip », le débit sanguin au niveau de l'avant-bras diminue sous la perfusion d'un inhibiteur de la NOS chez des sujets jeunes et sains (Endo et al. 1994). Lorsque le débit sanguin est corrigé par les valeurs mesurées au repos, les différences entre les conditions avant et après inhibition de la NOS disparaissent (Endo et al. 1994). En outre, il a été proposé que la perfusion d'inhibiteurs de la NOS au repos pourrait entraîner une fermeture des artérioles les plus petites se situant en amont des capillaires, empêchant ainsi l'accès de l'agent inhibiteur aux vaisseaux impliqués dans l'hyperémie à l'exercice (Bradley et al. 1999). En revanche, une inhibition réalisée au début de l'exercice permettrait à l'ensemble des vaisseaux sanguins impliqués dans l'hyperémie d'exercice d'être exposé à l'agent inhibiteur (Bradley et al. 1999). Dans notre étude, nous n'estimons pas le débit sanguin de repos à la suite des différentes conditions de traitement. Pour cette raison, nous ne pouvons pas exclure une éventuelle influence du débit sanguin de repos sur la mesure de la perfusion musculaire à l'exercice.

Musch et al. (2001) rapportent une diminution de la conductance vasculaire au niveau des muscles des membres postérieurs au cours d'un exercice de course d'intensité difficile, chez des rats sous perfusion d'un inhibiteur de la NOS. En outre, Copp et al. (2010b) montrent que chez le rat, la vitesse critique de course peut être un point de démarcation important dans les réponses métaboliques et vasculaires à l'exercice. Le débit sanguin au niveau des membres postérieurs est redistribué vers des fibres musculaires de type 2 lors de vitesses de course supérieures à la vitesse critique des rats (Copp et al. 2010b). À la suite d'une inhibition spécifique de la nNOS, le débit sanguin des membres postérieurs chez le rat est réduit lors de l'exercice de course à une vitesse supérieure à la vitesse critique (Copp et al. 2013). Cet effet de l'inhibition spécifique de la nNOS n'est pas observé lorsque les rats courent à des vitesses inférieures à leur vitesse critique (Copp et al. 2010c). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse

qu'un exercice de course à une intensité suffisamment élevée, au-delà de celle utilisée dans notre protocole, entraîne une diminution du débit sanguin musculaire à l'exercice, sous conditions ADMA et/ou ADMA + SMTC.

En outre, l'exercice sollicitant les membres inférieurs implique une proportion plus importante de la masse musculaire totale qui conduit à une élévation du débit sanguin jusqu'à 10 fois supérieure à celui de repos (Green et al. 2004b). Ceci pourrait induire une dilution des concentrations de l'inhibiteur de la NOS injecté, et conduire à une moindre inhibition de la synthèse de NO. La dose d'ADMA utilisée dans notre étude a été utilisée dans de précédents travaux montrant une élévation significative de la pression artérielle moyenne 30 min après le début de la perfusion (Augustyniak et al. 2006), mais nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que des doses plus importantes d'ADMA aurait pu être requises pour contrebalancer un éventuel risque de dilution des traitements infusés au cours de l'exercice.

L'effet de la perfusion de l'ADMA peut être aussi masqué par une activation des barorécepteurs en réponse à une augmentation des résistances vasculaires systémiques, en raison d'une réduction du débit sanguin aux muscles actifs lors de l'exercice. La perfusion d'un inhibiteur pharmacologique de la NOS élève la tension artérielle chez le lapin et réduit de façon réflexe l'activité sympathique (Liu et al. 1998). L'activité sympathique est à nouveau stimulée lorsqu'un antihypertenseur est administré à l'animal (Liu et al. 1998). Chez des rats ayant subi une dénervation sino-aortique, l'effet sympatho-inhibiteur après la perfusion d'un inhibiteur pharmacologique de la NOS disparaît, a contrario des rats ayant des barorécepteurs intacts (Augustyniak et al. 2006). L'activité sympathique chez les rats dénervés augmente de 150 % après le début de la perfusion de l'inhibiteur pharmacologique (Augustyniak et al. 2006). Lorsque l'ADMA est utilisée comme inhibiteur de la NOS, le même phénomène est rapporté avec une augmentation de 46 % de l'activité sympathique chez les rats dénervés, 180 min après le début de la perfusion (Augustyniak et al. 2006). Dans notre étude, nous n'avons pas été en mesure de déterminer si l'ADMA élève la tension artérielle avant ou au cours de l'exercice chez les rats sains, en raison de l'absence de mesure de la tension artérielle.

DISCUSSION GENERALE

Pour rappel, les objectifs principaux de la Thèse étaient 1) de déterminer si la modulation de la biodisponibilité du NO, via l'inhibition de sa synthèse par l'ADMA, ou l'apport exogène de NO_3^- d'origine alimentaire, affecte la perfusion musculaire dépendante du NO, et 2) d'établir si l'aptitude aérobie a une influence sur les facteurs pouvant réguler la biodisponibilité du NO.

Dans une première étude, sous la forme d'une revue systématique et d'une méta-analyse, nous montrons une réduction significative du $\dot{V}O_2$ au cours de l'exercice d'intensité sous-maximale à la suite d'une supplémentation en NO_3^-, mais cet effet disparaît lorsque l'intensité de l'exercice est au-delà d'une intensité difficile. Quelques études rapportent que l'amélioration de la tolérance à l'effort est associée à une diminution du $\dot{V}O_2$ lors d'exercices d'intensité difficile à la suite une supplémentation en NO_3^- (Bailey et al. 2009, 2010; Lansley et al. 2011b; Wylie et al. 2013a). Toutefois, l'absence de diminution du $\dot{V}O_2$ avec l'augmentation de l'intensité à l'exercice dans cette présente méta-analyse suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'amélioration de la tolérance à l'effort après une supplémentation en NO_3^-. Chez les patients atteints d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, l'amélioration de la tolérance à l'effort est accompagnée d'une moindre désoxygénation musculaire à l'exercice après une supplémentation en jus de betterave rouge (Kenjale et al. 2011). Dans cette pathologie, un déséquilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2, en raison d'une perfusion périphérique altérée, peut limiter l'aptitude aérobie, et a fortiori la tolérance à l'effort (Haas et al. 2012). Chez des sujets sains modérément entraînés, nous avons précédemment montré que l'amélioration de la tolérance à l'effort au cours d'un exercice intermittent supramaximal, après une supplémentation en jus de betterave rouge, est accompagnée d'un maintien de la perfusion musculaire entre les périodes actives et passives lors des répétitions (Aucouturier et al. 2015). Cette modalité d'exercice entraîne un recrutement préférentiel des fibres musculaires de type 2 pour lesquelles la perfusion microvasculaire est particulièrement sensible aux variations de biodisponibilité du NO (Ferguson et al. 2013a; Copp et al. 2013; Ferguson et al. 2013b, 2015). L'augmentation de la proportion de fibres musculaires de type 2 dans certaines pathologies cardiovasculaires contribuerait à limiter la tolérance à l'effort (Poole et al. 2012; Jones et al. 2016). La supplémentation en NO_3^- peut alors améliorer la tolérance à l'effort chez des patients atteints de pathologies chroniques avec une altération de l'apport et/ou l'utilisation de l'O_2 au niveau musculaire (Kenjale et al. 2011; Zamani et al. 2015; Berry et al. 2015). Selon notre méta-analyse, la supplémentation en NO_3^- ne réduit pourtant pas le $\dot{V}O_2$ au cours d'exercices d'intensités sous-maximales chez les patients

présentant une pathologie chronique. Par conséquent, à la vue de ces résultats, la supplémentation en NO_3^- semble, d'une part réduire le $\dot{V}O_2$ lors d'exercices d'intensité modérée à élevée, notamment à travers une amélioration de l'efficience mitochondriale (Clerc et al. 2007; Larsen et al. 2011a) ; et d'autre part augmenter la perfusion musculaire lors d'exercices se réalisant au-delà d'une intensité difficile (Aucouturier et al. 2015; Jones et al. 2016). Une amélioration de la disponibilité en O_2, à travers une augmentation de l'apport et/ou une réduction de l'utilisation de l'O_2, pourrait renforcer la stabilité métabolique (Zoladz et al. 2006). Un maintien de la stabilité métabolique pourrait retarder le processus de fatigue musculaire, en préservant le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (Grassi et al. 2011). Toutefois, les adaptations physiologiques induites par l'entraînement en endurance peuvent altérer l'effet ergogénique de la supplémentation en NO_3^- lors d'exercices sous-maximaux et maximaux (Hoon et al. 2013; Porcelli et al. 2015; Carriker et al. 2016). En raison de l'absence d'une méta-régression dans notre méta-analyse, nous n'avons pas pu déterminer si le niveau d'aptitude aérobie des sujets influence les effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$.

Dans une seconde étude, nous n'observons pas d'amélioration de la tolérance à l'effort au cours d'un exercice intermittent d'intensité supramaximale à la suite d'une supplémentation en NO_3^- chez des sujets entraînés en endurance avec une aptitude aérobie élevée ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$). Ces résultats sont à l'opposé de ceux observés chez des sujets ayant une aptitude aérobie plus faible ($\dot{V}O_{2max} \leq 50$ $mL.min^{-1}.kg^{-1}$), tels que les joueurs de sports collectifs (Wylie et al. 2013b; Aucouturier et al. 2015; Wylie et al. 2016a; Porcelli et al. 2016). Les autres résultats majeurs de cette seconde étude sont une absence d'effets de la supplémentation en NO_3^- sur le $\dot{V}O_2$, l'oxygénation et la désoxygénation musculaires ainsi que sur le volume sanguin local lors de l'exercice intermittent supramaximal. Ces observations sont contraires à celles précédemment rapportées au cours d'exercices d'intensité sous-maximale, chez des sujets ayant une aptitude aérobie faible à modérée (Bailey et al. 2009, 2010; Lansley et al. 2011b; Wylie et al. 2013a; Jones 2014; Pawlak-Chaouch et al. 2016). Cependant, nos résultats sont en accord avec de précédents travaux, dans lesquels aucun changement du $\dot{V}O_2$ n'est observé lors d'exercices d'intensité supramaximale (Martin et al. 2014; Aucouturier et al. 2015; Wylie et al. 2016a). L'exercice intermittent supramaximal semble réunir les conditions favorables pour potentialiser les effets de la supplémentation en NO_3^- puisque la conversion du NO_2^- en NO par la désoxyhémoglobine et la désoxymyoglobine est renforcée en conditions hypoxique et acide (Cosby et al. 2003; Shiva et al. 2007), et que ces conditions sont présentes au niveau musculaire lors de l'exercice supramaximal (Modin et al. 2001). La production du

NO via la réduction du NO_2^- contribue à la vasodilatation au niveau musculaire et à l'inhibition de la respiration mitochondriale (Cosby et al. 2003; Shiva et al. 2007). Ces deux derniers facteurs facilitent l'apport en O_2 aux muscles actifs et améliorent l'efficience oxydative respectivement, se traduisant ainsi par une réduction du coût en O_2 lors d'exercices sous-maximaux (Jones 2014). En outre, l'exercice d'intensité supramaximale recrute une forte proportion de fibres musculaires de type 2, lesquelles sont particulièrement sensibles aux effets de la supplémentation en NO_3^- sur la perfusion musculaire (Ferguson et al. 2013a, 2015; Jones et al. 2016). Toutefois, l'amélioration de la tolérance à l'effort dans cette modalité d'exercice ne semble pas liée à une réduction du coût en O_2, a contrario des exercices sous-maximaux (Martin et al. 2014; Aucouturier et al. 2015). De plus, nous avons précédemment observé, chez les sujets ayant une aptitude aérobie modérée, une diminution des fluctuations du $\dot{V}O_2$ et du $\dot{V}CO_2$, ainsi qu'une augmentation des fluctuations du $\dot{V}E$ au cours de l'exercice intermittent supramaximal après une supplémentation NO_3^- (Aucouturier et al. 2015), mais ces fluctuations ne sont pas présentes chez les sujets entraînés en endurance. Par ailleurs, dans notre étude, la supplémentation en NO_3^- chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) et dotés d'une forte proportion de fibres musculaires de type 1, ne renforce pas l'indice de perfusion musculaire estimé par la spectroscopie du proche infrarouge, lors de l'exercice intermittent d'intensité supramaximale. L'absence de ces réponses physiologiques chez les sujets entraînés en endurance semble confirmer que les effets de la supplémentation en NO_3^- diffèrent selon le niveau d'aptitude aérobie des sujets.

Dans une troisième étude, nous ne rapportons pas de différence significative des concentrations plasmatiques d'ADMA entre un groupe d'athlètes entraînés en endurance (HI-FIT) et un groupe constitué de sujets ayant une faible aptitude aérobie (LO-FIT). Malgré un $\dot{V}O_{2max}$ supérieur de 60 % chez le groupe HI-FIT comparativement au groupe LO-FIT, les concentrations plasmatiques d'ADMA ne sont pas associées au profil de la désoxygénation musculaire au cours de l'exercice dans cette population de sujets jeunes et sains. L'ensemble de ces résultats supporte l'hypothèse que chez les sujets sains les différences interindividuelles de $\dot{V}O_{2max}$ ne sont pas liées à la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Montero et al. 2014, 2015). Dans une revue systématique, Montero (2015) montre que le $\dot{V}O_{2max}$ est significativement associé à la fonction endothéliale dans moins de 50 % des études portant chez des sujets sains, et ceci indépendamment de l'âge. Le remodelage artériel, à travers notamment une augmentation du diamètre artériel, pourrait être un facteur plus important dans la capacité d'élévation du débit sanguin et de l'apport en O_2 à l'exercice, chez des sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$

élevé (Green et al. 2004b, 2012). Dans une méta-analyse, Montero et al. (2014) rapportent que les athlètes âgés présentent une vasodilatation dépendante de l'endothélium supérieure par rapport à celle des sujets contrôles, appariés selon l'âge. Cette différence n'est pas observée lorsque la comparaison est effectuée chez les sujets jeunes (athlètes versus contrôles) (Montero et al. 2014). La taille de l'artère brachiale est augmentée chez les athlètes jeunes par rapport aux sujets contrôles appariés alors que la taille de cette même artère est similaire chez les sujets âgés (athlètes versus contrôles) (Montero et al. 2014). Ces observations sont supportées par la relation inverse entre le diamètre des artères des membres inférieurs et supérieurs et la fonction vasculaire rapportée chez des sujets sains (Thijssen et al. 2008). Ainsi, Green et al. (2004b) ont suggéré que l'entraînement sur le long terme induirait un remodelage artériel afin de diminuer les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur les parois vasculaires, rendant ainsi la réponse vasodilatatrice aigue à l'exercice moins prépondérante. Chez l'homme, les adaptations vasculaires induites par les forces de cisaillement ont une évolution temporelle différente aux niveaux fonctionnel et structural, à la suite d'un entraînement de 8 semaines de type « handgrip » (Tinken et al. 2010). La vasodilatation dépendante de l'endothélium augmente jusqu'à 6 semaines après le début de l'entraînement, mais retourne à son niveau pré-entraînement à la 8ème semaine (Tinken et al. 2010). Le remodelage artériel progresse sur les 8 semaines d'entraînement (Tinken et al. 2010). Ainsi, le remodelage artériel chez les sujets entraînés pourrait réduire l'influence du NO dans l'apport en O_2 aux muscles, et a fortiori éviter tout effet de l'ADMA sur la perfusion musculaire à l'exercice dans cette population.

Dans une quatrième étude, nous n'avons observé aucun effet de l'ADMA sur la perfusion musculaire au cours d'un exercice sur tapis roulant d'intensité modérée chez le rat. In vitro, l'ADMA semble apparaitre comme un inhibiteur endogène potentiel de la NO synthase qui inhiberait à la fois les isoformes nNOS et eNOS (Cardounel et al. 2005, 2007). Ces 2 isoformes sont exprimées au sein des muscles squelettiques (Nakane et al. 1993; Kapur et al. 1997). Chez l'animal, l'inhibition pharmacologique de la NOS réduit la réponse vasodilatatrice à l'ACh au repos (Hirai et al. 1994) et le débit sanguin aux muscles squelettiques au cours de l'exercice (Hirai et al. 1994; Maxwell et al. 1998). La réduction du débit sanguin est corrélée au pourcentage de fibres musculaires de type 1 (Hirai et al. 1994). Dans notre étude, la typologie musculaire n'affecte pas les effets de l'ADMA sur la perfusion musculaire au cours de l'exercice sur tapis roulant. Ces résultats controversés étayent la complexité de la contribution du NO à la perfusion musculaire lors de l'exercice. Cette contribution du NO semble être sous l'influence des profils de forces de cisaillement sur les parois vasculaires d'une part, et des

modalités d'exercice d'autre part. Green et al. (2005), qui ont étudié le débit sanguin au niveau de l'avant-bras lors d'une épreuve d'effort sur bicyclette et lors d'un exercice de type « handgrip » chez des sujets sains, ont observé que l'inhibition pharmacologique des NOS diminue le débit sanguin uniquement lors de l'exercice sur bicyclette. Cette inhibition spécifique à l'exercice sur bicyclette peut s'expliquer par une forte proportion de flux sanguin rétrograde lors de la diastole, faisant apparaître un profil oscillatoire du flux sanguin lors de l'exercice (Green et al. 2005). La contribution du NO varie selon le type d'exercice réalisé, probablement en raison de différents profils de flux sanguins qui peuvent réguler la stimulation de la synthèse du NO (Green et al. 2005).

En outre, la localisation du site de mesure au niveau des artères semble également influencer la réponse de la vasodilatation dépendante du NO. La comparaison de valeurs de FMD mesurée au niveau des membres supérieurs et inférieurs chez des sujets sains ne révèle aucune association entre les valeurs obtenues au niveau de l'artère brachiale et les artères localisées au niveau des membres inférieurs (Thijssen et al. 2011b). Ainsi, la vasodilatation dépendante du NO ne peut être présentée comme uniforme à travers l'ensemble de l'organisme (Thijssen et al. 2008, 2011b). Au cours de l'exercice, la participation du NO dans la vasodilatation périphérique peut être masquée par la libération de nombreux agents vasodilatateurs, tels que l'ATP, l'adénosine et les prostaglandines, par l'endothélium et les muscles squelettiques (Clifford et Hellsten 2004; Murrant et Sarelius 2015). L'inhibition d'un des mécanismes responsables de la vasodilatation à l'exercice pourrait entraîner une augmentation de la contribution d'autres voies compensatrices dans la vasodilatation périphérique, faisant ainsi émerger le concept de redondance dans le contrôle de la perfusion musculaire à l'exercice (Boushel et Kjaer 2004). Schrage et al. (2004) montrent que le débit sanguin est diminué de 20 % au niveau de l'artère brachiale lors d'un exercice de 20 min de type « handgrip » à la suite de la perfusion d'un inhibiteur de la NOS chez des sujets sains. Dans cette même étude, la perfusion d'un inhibiteur des prostaglandines réduit de façon transitoire le débit sanguin musculaire, mais la combinaison des deux inhibitions ne montre pas d'effets additifs dans l'altération de la perfusion musculaire (Schrage et al. 2004). Ainsi, ces deux voies normalement impliquées dans le processus de vasodilatation agissent de façon indépendante, et l'inhibition simultanée du NO et des prostaglandines peut être compensée par d'autres facteurs pour maintenir le débit sanguin à l'exercice. Cependant, Hickner et al. (1997) rapportent une contribution plus marquée du NO à l'hyperémie à l'exercice au niveau des membres inférieurs, avec une réduction de 50 % du débit sanguin à la suite de la perfusion d'un

inhibiteur de la NOS au niveau du vaste latéral. Par conséquent, en raison de la complexité du contrôle de l'hyperémie à l'exercice, l'absence d'effets manifestes de l'ADMA sur la perfusion musculaire à l'exercice dans la présente étude pourrait s'expliquer par une contribution accrue d'autres facteurs dans la vasodilatation, masquant ainsi toute réduction de la perfusion musculaire induite par l'ADMA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans une première étude, sous la forme d'une revue systématique et d'une méta-analyse, nous avons étudié si la supplémentation en NO_3^- *(versus placebo)* réduit le coût en O_2 de la contraction musculaire, participant ainsi à diminuer le $\dot{V}O_2$ à l'exercice et à préserver la disponibilité en O_2. Cette dernière est déterminée par l'équilibre entre l'apport et l'utilisation de l'O_2 au niveau tissulaire. De ce fait, une amélioration de la tolérance à l'effort, à la suite de la supplémentation en NO_3^-, peut être expliquée par une redistribution du débit sanguin aux muscles actifs et/ou une diminution du coût en O_2 au cours de l'exercice. Ainsi, nous avons montré qu'une supplémentation en NO_3^- réduit le coût en O_2 au cours d'exercices d'intensité modérée à élevée chez des sujets jeunes et sains. Cet effet ne semble pas maintenu lorsque l'intensité d'exercice augmente vers les capacités maximales des sujets. Les effets de la supplémentation en NO_3^- peuvent être intéressants dans le cadre de pathologies chroniques, où une altération de l'apport et/ou de l'utilisation de l'O_2 limite la tolérance à l'effort et affecte la qualité de vie.

Dans une seconde étude, nous avons exploré l'effet d'une supplémentation en NO_3^-, par le biais de jus de betterave rouge, sur la tolérance à l'exercice, au cours d'un exercice intermittent à intensité supramaximale, chez des sujets entraînés en endurance. Cette population serait moins sensible aux effets ergogéniques de la supplémentation en NO_3^- en raison des adaptations physiologiques induites par l'entraînement en endurance lors d'exercices sous-maximaux et maximaux. Ainsi, nous démontrons que les sujets ayant un $\dot{V}O_{2max}$ élevé (> 65 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) ne présentent pas les bénéfices de la supplémentation en NO_3^- sur le métabolisme aérobie et la perfusion musculaire au cours d'un exercice intermittent d'intensité supramaximale, contrairement aux sujets modérément entraînés, caractérisés par une aptitude aérobie plus faible ($\dot{V}O_{2max} \leq 50$ $mL.min^{-1}.kg^{-1}$). Les facteurs à l'origine de l'absence d'effet de la supplémentation en NO_3^- dans des populations présentant une aptitude aérobie élevée restent à déterminer. De futures études sont nécessaires pour trouver les caractéristiques de la supplémentation en NO_3^- (durée, dose, forme) susceptibles de faire émerger les effets du NO_3^- à l'exercice chez des sujets entraînés en endurance.

Dans une troisième étude, nous avons investigué si l'aptitude aérobie et l'apport en O_2 sont liés aux concentrations plasmatiques d'ADMA chez des sujets jeunes et sans pathologie chronique. En effet, une augmentation de la concentration plasmatique d'ADMA est associée à une altération de l'aptitude aérobie dans diverses pathologies cardiovasculaires, comme l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs et l'insuffisance cardiaque. L'ADMA

pourrait être un facteur indépendant dans la régulation de la perfusion musculaire dépendante du NO, et pourrait affecter l'apport en O_2 nécessaire au métabolisme aérobie. Ainsi, nous rapportons qu'une grande différence dans les niveaux d'aptitude aérobie chez des sujets jeunes et sains n'est pas associée aux concentrations plasmatiques d'ADMA, contrairement aux populations atteintes de pathologies cardiovasculaires ou présentant des risques cardiovasculaires. L'ADMA pourrait agir directement sur la fonction cardiaque chez ces dernières populations, sans pour autant contribuer à des changements au niveau hémodynamique. En outre, l'entraînement en endurance pourrait rendre difficile l'utilisation des concentrations plasmatiques d'ADMA comme biomarqueur en stimulant le renouvellement des protéines au niveau musculaire, et/ou en altérant l'expression et/ou l'activité des transporteurs d'acides aminés cationiques.

Dans une quatrième étude, nous avons examiné l'effet de l'ADMA sur la perfusion musculaire lors d'un exercice de course sur tapis roulant chez le rat. L'ADMA apparaît comme un inhibiteur fonctionnel in vitro de la eNOS et de la nNOS, lesquelles sont exprimées au sein du muscle squelettique. De ce fait, un niveau plasmatique élevé d'ADMA pourrait réduire la perfusion musculaire dépendante du NO. Nous démontrons que l'ADMA n'a pas d'effet sur le débit sanguin musculaire lors de l'exercice de course d'intensité modérée chez le rat après sa perfusion. L'ADMA pourrait être un inhibiteur spécifique de la nNOS, laquelle est majoritairement exprimée au niveau des fibres musculaires de type 2. Une vitesse de course au-delà de la vitesse critique pourrait entraîner une diminution du débit sanguin musculaire à l'exercice sous perfusion d'ADMA, en raison d'une redistribution du débit sanguin vers les fibres musculaires de type 2 lors de l'exercice dans ce domaine d'intensité.

Toutefois, l'ensemble de nos résultats montre que l'ADMA n'est pas un facteur indépendant dans la régulation du débit sanguin et de l'apport en O_2 aux muscles squelettiques au cours de l'exercice. Ainsi, l'ADMA pourrait être un simple biomarqueur des processus inflammatoires et du stress oxydant dans le cadre de pathologies chroniques ou de populations à risques cardiovasculaires. Les variations de concentrations plasmatiques d'ADMA refléteraient les altérations présentes au niveau de sa dégradation via la diméthylaminohydrolase diméthylarginine ou de sa synthèse via les protéines arginine méthyltransférases.

REFERENCES

Abernethy PJ, Thayer R, Taylor AW (1990) Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise. A review. Sports Med 10:365–389

Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al (2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23:1455–1459. doi: 10.1161/01.ATV.0000081742.92006.59

Allen DG, Lamb GD, Westerblad H (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. Physiol Rev 88:287–332. doi: 10.1152/physrev.00015.2007

Alvares TS, Conte-Junior CA, Silva JT, Paschoalin VMF (2012) Acute L-Arginine supplementation does not increase nitric oxide production in healthy subjects. Nutr Metab 9:54. doi: 10.1186/1743-7075-9-54

Amann M (2012) Pulmonary system limitations to endurance exercise performance in humans. Exp Physiol 97:311–318. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058800

Andersen P, Saltin B (1985) Maximal perfusion of skeletal muscle in man. J Physiol 366:233–249

Anderson TJ, Charbonneau F, Title LM, et al (2011) Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. Circulation 123:163–169. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.953653

Ardigo D, Stüehlinger M, Franzini L, et al (2007) ADMA is independently related to flow-mediated vasodilation in subjects at low cardiovascular risk. Eur J Clin Invest 37:263–269. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01781.x

Aucouturier J, Boissière J, Pawlak-Chaouch M, et al (2015) Effect of dietary nitrate supplementation on tolerance to supramaximal intensity intermittent exercise. Nitric Oxide 49:16–25. doi: 10.1016/j.niox.2015.05.004

Augustyniak RA, Victor RG, Morgan DA, Zhang W (2006) L-NAME- and ADMA-induced sympathetic neural activation in conscious rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290:R726-732. doi: 10.1152/ajpregu.00768.2004

Bada AA, Svendsen JH, Secher NH, et al (2012) Peripheral vasodilatation determines cardiac output in exercising humans: insight from atrial pacing. J Physiol 590:2051–2060. doi: 10.1113/jphysiol.2011.225334

Baggish AL, Yared K, Weiner RB, et al (2010) Differences in cardiac parameters among elite rowers and subelite rowers. Med Sci Sports Exerc 42:1215–1220. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181c81604

Bagher P, Segal SS (2011) Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. Acta Physiol 202:271–284. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02244.x

Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A, et al (2010) Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. J Appl Physiol 109:135–148. doi: 10.1152/japplphysiol.00046.2010

Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, et al (2009) Dietary nitrate supplementation reduces the O2 cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. J Appl Physiol 107:1144–1155. doi: 10.1152/japplphysiol.00722.2009

Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VWM (2009) Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. Cell Tissue Res 335:165–189. doi: 10.1007/s00441-008-0685-6

Barclay CJ, Woledge RC, Curtin NA (2007) Energy turnover for Ca2+ cycling in skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil 28:259–274. doi: 10.1007/s10974-007-9116-7

Bassett DR, Howley ET (2000) Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. Med Sci Sports Exerc 32:70–84

Bassett DR, Howley ET (1997) Maximal oxygen uptake: "classical" versus "contemporary" viewpoints. Med Sci Sports Exerc 29:591–603

Basu S, Azarova NA, Font MD, et al (2008) Nitrite reductase activity of cytochrome c. J Biol Chem 283:32590–32597. doi: 10.1074/jbc.M806934200

Behnke BJ, McDonough P, Padilla DJ, et al (2003) Oxygen exchange profile in rat muscles of contrasting fibre types. J Physiol 549:597–605. doi: 10.1113/jphysiol.2002.035915

Bentley RF, Walsh JJ, Drouin PJ, et al (2017) Dietary nitrate restores compensatory vasodilation and exercise capacity in response to a compromise in oxygen delivery in the noncompensator phenotype. J Appl Physiol 123:594–605. doi: 10.1152/japplphysiol.00953.2016

Berry MJ, Justus NW, Hauser JI, et al (2015) Dietary nitrate supplementation improves exercise performance and decreases blood pressure in COPD patients. Nitric Oxide 48:22–30. doi: 10.1016/j.niox.2014.10.007

Bescós R, Rodríguez FA, Iglesias X, et al (2011) Acute administration of inorganic nitrate reduces VO(2peak) in endurance athletes. Med Sci Sports Exerc 43:1979–1986. doi: 10.1249/MSS.0b013e318217d439

Blackwell S (2010) The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine. Ann Clin Biochem 47:17–28. doi: 10.1258/acb.2009.009196

Blackwell S, O'Reilly DSJ, Talwar D (2007) Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. Eur J Clin Invest 37:364–371. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01798.x

Blei ML, Conley KE, Kushmerick MJ (1993) Separate measures of ATP utilization and recovery in human skeletal muscle. J Physiol 465:203–222

Bode-Böger SM, Scalera F, Ignarro LJ (2007) The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. Pharmacol Ther 114:295–306. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.002

Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, et al (2006) Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. J Am Soc Nephrol 17:1128–1134. doi: 10.1681/ASN.2005101119

Böger RH (2006) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. Ann Med 38:126–136. doi: 10.1080/07853890500472151

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, et al (1998) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. Circulation 98:1842–1847

Böger RH, Sydow K, Borlak J, et al (2000) LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Circ Res 87:99–105

Bond V, Curry BH, Adams RG, et al (2014) Cardiorespiratory function associated with dietary nitrate supplementation. Appl Physiol Nutr Metab 39:168–172. doi: 10.1139/apnm-2013-0263

Boone J, Koppo K, Barstow TJ, Bouckaert J (2009) Pattern of deoxy[Hb+Mb] during ramp cycle exercise: influence of aerobic fitness status. Eur J Appl Physiol 105:851–859. doi: 10.1007/s00421-008-0969-2

Boorsma RK, Whitfield J, Spriet LL (2014) Beetroot juice supplementation does not improve performance of elite 1500-m runners. Med Sci Sports Exerc 46:2326–2334. doi: 10.1249/MSS.0000000000000364

Bose S, French S, Evans FJ, et al (2003) Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. J Biol Chem 278:39155–39165. doi: 10.1074/jbc.M306409200

Bouchard C, An P, Rice T, et al (1999) Familial aggregation of VO(2max) response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. J Appl Physiol 87:1003–1008

Bouchard C, Daw EW, Rice T, et al (1998) Familial resemblance for VO2max in the sedentary state: the HERITAGE family study. Med Sci Sports Exerc 30:252–258

Boushel R, Gnaiger E, Calbet JAL, et al (2011) Muscle mitochondrial capacity exceeds maximal oxygen delivery in humans. Mitochondrion 11:303–307. doi: 10.1016/j.mito.2010.12.006

Boushel R, Kjaer M (2004) Redundancy reflects versatility of blood flow regulation mechanisms. J Physiol 557:346. doi: 10.1113/jphysiol.2004.066548

Bradley SJ, Kingwell BA, McConell GK (1999) Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. Diabetes 48:1815–1821

Brand MD (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. Biochem Soc Trans 33:897–904. doi: 10.1042/BST20050897

Breese BC, McNarry MA, Marwood S, et al (2013) Beetroot juice supplementation speeds O2 uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 305:R1441-1450. doi: 10.1152/ajpregu.00295.2013

Breese BC, Poole DC, Okushima D, et al (2017) The effect of dietary nitrate supplementation on the spatial heterogeneity of quadriceps deoxygenation during heavy-intensity cycling. Physiol Rep 5:. doi: 10.14814/phy2.13340

Brown GC (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. Biochim Biophys Acta 1504:46–57

Brown GC (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. Biochem J 284 (Pt 1):1–13

Cantu-Medellin N, Kelley EE (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. Nitric Oxide 34:19–26. doi: 10.1016/j.niox.2013.02.081

Cardounel AJ, Cui H, Samouilov A, et al (2007) Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. J Biol Chem 282:879–887. doi: 10.1074/jbc.M603606200

Cardounel AJ, Xia Y, Zweier JL (2005) Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin. J Biol Chem 280:7540–7549. doi: 10.1074/jbc.M410241200

Carlson BE, Arciero JC, Secomb TW (2008) Theoretical model of blood flow autoregulation: roles of myogenic, shear-dependent, and metabolic responses. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295:H1572-1579. doi: 10.1152/ajpheart.00262.2008

Carriker CR, Vaughan RA, VanDusseldorp TA, et al (2016) Nitrate-Containing Beetroot Juice Reduces Oxygen Consumption During Submaximal Exercise in Low but Not High Aerobically Fit Male Runners. J Exerc Nutr Biochem 20:27–34. doi: 10.20463/jenb.2016.0029

Castello PR, David PS, McClure T, et al (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. Cell Metab 3:277–287. doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.011

Cermak NM, Gibala MJ, van Loon LJC (2012) Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists. Int J Sport Nutr Exerc Metab 22:64–71

Charkoudian N, Joyner MJ, Barnes SA, et al (2006) Relationship between muscle sympathetic nerve activity and systemic hemodynamics during nitric oxide synthase inhibition in humans. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291:H1378-1383. doi: 10.1152/ajpheart.00234.2006

Chen J, Ye Z, Wang X, et al (2018) Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. Biomed Pharmacother 97:423–428. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.122

Christensen PM, Nyberg M, Bangsbo J (2013) Influence of nitrate supplementation on VO_2 kinetics and endurance of elite cyclists. Scand J Med Sci Sports 23:e21-31. doi: 10.1111/sms.12005

Christensen PM, Petersen NK, Friis SN, et al (2017) Effects of nitrate supplementation in trained and untrained muscle are modest with initial high plasma nitrite levels. Scand J Med Sci Sports. doi: 10.1111/sms.12848

Clerc P, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E (2007) Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. J Bioenerg Biomembr 39:158–166. doi: 10.1007/s10863-007-9074-1

Clifford PS, Hellsten Y (2004) Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. J Appl Physiol 97:393–403. doi: 10.1152/japplphysiol.00179.2004

Clifford PS, Kluess HA, Hamann JJ, et al (2006) Mechanical compression elicits vasodilatation in rat skeletal muscle feed arteries. J Physiol 572:561–567. doi: 10.1113/jphysiol.2005.099507

Coggan AR, Leibowitz JL, Kadkhodayan A, et al (2015) Effect of acute dietary nitrate intake on maximal knee extensor speed and power in healthy men and women. Nitric Oxide 48:16–21. doi: 10.1016/j.niox.2014.08.014

Cohen KD, Berg BR, Sarelius IH (2000) Remote arteriolar dilations in response to muscle contraction under capillaries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278:H1916-1923

Colburn TD, Ferguson SK, Holdsworth CT, et al (2017) Effect of sodium nitrite on local control of contracting skeletal muscle microvascular oxygen pressure in healthy rats. J Appl Physiol 122:153–160. doi: 10.1152/japplphysiol.00367.2016

Cooke JP (2000) Does ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:2032–2037

Cooke JP (2004) The pivotal role of nitric oxide for vascular health. Can J Cardiol 20 Suppl B:7B–15B

Copp SW, Hirai DM, Hageman KS, et al (2010a) Nitric oxide synthase inhibition during treadmill exercise reveals fiber-type specific vascular control in the rat hindlimb. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298:R478-485. doi: 10.1152/ajpregu.00631.2009

Copp SW, Hirai DM, Musch TI, Poole DC (2010b) Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment. J Physiol 588:5077–5087. doi: 10.1113/jphysiol.2010.198382

Copp SW, Hirai DM, Schwagerl PJ, et al (2010c) Effects of neuronal nitric oxide synthase inhibition on resting and exercising hindlimb muscle blood flow in the rat. J Physiol 588:1321–1331. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183723

Copp SW, Holdsworth CT, Ferguson SK, et al (2013) Muscle fibre-type dependence of neuronal nitric oxide synthase-mediated vascular control in the rat during high speed treadmill running. J Physiol 591:2885–2896. doi: 10.1113/jphysiol.2013.251082

Cornelissen VA, Fagard RH (2005) Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. Hypertension 1979 46:667–675. doi: 10.1161/01.HYP.0000184225.05629.51

Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, et al (2003) Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nat Med 9:1498–1505. doi: 10.1038/nm954

Curtis E, Hsu LL, Noguchi AC, et al (2012) Oxygen regulates tissue nitrite metabolism. Antioxid Redox Signal 17:951–961. doi: 10.1089/ars.2011.4242

Cynober LA (2002) Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. Nutrition 18:761–766

De Pauw K, Roelands B, Cheung SS, et al (2013) Guidelines to classify subject groups in sport-science research. Int J Sports Physiol Perform 8:111–122

De Wit C (2004) Connexins pave the way for vascular communication. News Physiol Sci 19:148–153

Deftereos S, Bouras G, Tsounis D, et al (2014) Association of asymmetric dimethylarginine levels with treadmill-stress-test-derived prognosticators. Clin Biochem 47:593–598. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.01.031

DeLorey DS (2005) Adaptation of pulmonary O2 uptake kinetics and muscle deoxygenation at the onset of heavy-intensity exercise in young and older adults. J Appl Physiol 98:1697–1704. doi: 10.1152/japplphysiol.00607.2004

Delp MD, Duan C (1996) Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. J Appl Physiol 80:261–270

Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH (1993) Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. J Appl Physiol 75:1354–1363

DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, et al (2000) Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. Circulation 102:1351–1357

Donato AJ, Uberoi A, Wray DW, et al (2006) Differential effects of aging on limb blood flow in humans. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290:H272-278. doi: 10.1152/ajpheart.00405.2005

Ekblom B, Hermansen L (1968) Cardiac output in athletes. J Appl Physiol 25:619–625

El Assar M, Angulo J, Santos-Ruiz M, et al (2016) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) elevation and arginase up-regulation contribute to endothelial dysfunction related to insulin resistance in rats and morbidly obese humans: Vascular ADMA and arginase in morbid obesity. J Physiol 594:3045–3060. doi: 10.1113/JP271836

Ellsworth ML, Sprague RS (2012) Regulation of blood flow distribution in skeletal muscle: role of erythrocyte-released ATP. J Physiol 590:4985–4991. doi: 10.1113/jphysiol.2012.233106

Endo T, Imaizumi T, Tagawa T, et al (1994) Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm. Circulation 90:2886–2890

Even PC, Nadkarni NA (2012) Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 303:R459-476. doi: 10.1152/ajpregu.00137.2012

Ferguson S, Gledhill N, Jamnik VK, et al (2001) Cardiac performance in endurance-trained and moderately active young women. Med Sci Sports Exerc 33:1114–1119

Ferguson SK, Hirai DM, Copp SW, et al (2013a) Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. J Physiol 591:547–557. doi: 10.1113/jphysiol.2012.243121

Ferguson SK, Hirai DM, Copp SW, et al (2013b) Effects of nitrate supplementation via beetroot juice on contracting rat skeletal muscle microvascular oxygen pressure dynamics. Respir Physiol Neurobiol 187:250–255. doi: 10.1016/j.resp.2013.04.001

Ferguson SK, Holdsworth CT, Wright JL, et al (2015) Microvascular oxygen pressures in muscles comprised of different fiber types: Impact of dietary nitrate supplementation. Nitric Oxide 48:38–43. doi: 10.1016/j.niox.2014.09.157

Ferreira LF, Koga S, Barstow TJ (2007) Dynamics of noninvasively estimated microvascular O2 extraction during ramp exercise. J Appl Physiol 103:1999–2004. doi: 10.1152/japplphysiol.01414.2006

Fleming I, Busse R (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284:R1-12. doi: 10.1152/ajpregu.00323.2002

Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span--from yeast to humans. Science 328:321–326. doi: 10.1126/science.1172539

Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 33:829–837, 837a–837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304

Frandsen U, Höffner L, Betak A, et al (2000) Endurance training does not alter the level of neuronal nitric oxide synthase in human skeletal muscle. J Appl Physiol 89:1033–1038

Ganz T, Wainstein J, Gilad S, et al (2017) Serum asymmetric dimethylarginine and arginine levels predict microvascular and macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab Res Rev 33:. doi: 10.1002/dmrr.2836

Gao Y (2010) The multiple actions of NO. Pflugers Arch 459:829–839. doi: 10.1007/s00424-009-0773-9

Garton FC, North KN, Koch LG, et al (2016) Rodent models for resolving extremes of exercise and health. Physiol Genomics 48:82–92. doi: 10.1152/physiolgenomics.00077.2015

Gibala MJ (2007) Protein metabolism and endurance exercise. Sports Med 37:337–340

Gilchrist M, Winyard PG, Benjamin N (2010) Dietary nitrate--good or bad? Nitric Oxide 22:104–109. doi: 10.1016/j.niox.2009.10.005

Gladwin MT, Kim-Shapiro DB (2008) The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. Blood 112:2636–2647. doi: 10.1182/blood-2008-01-115261

Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, et al (2005) The emerging biology of the nitrite anion. Nat Chem Biol 1:308–314. doi: 10.1038/nchembio1105-308

Golub AS, Pittman RN (2013) Bang-bang model for regulation of local blood flow. Microcirculation 20:455–483. doi: 10.1111/micc.12051

Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas ACP, Tanus-Santos JE (2008) Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome. Nitric Oxide 19:345–350. doi: 10.1016/j.niox.2008.08.005

Gonzalez NC, Kirkton SD, Howlett RA, et al (2006) Continued divergence in VO2max of rats artificially selected for running endurance is mediated by greater convective blood O2 delivery. J Appl Physiol 101:1288–1296. doi: 10.1152/japplphysiol.01527.2005

Goralczyk T, Tisonczyk J, Fijorek K, Undas A (2012) High tea and vegetable consumption is associated with low ADMA generation in older healthy subjects. Metabolism 61:1171–1176. doi: 10.1016/j.metabol.2011.12.013

Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO (2008) The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. Nitric Oxide 19:333–337. doi: 10.1016/j.niox.2008.08.003

Grassi B, Porcelli S, Salvadego D, Zoladz JA (2011) Slow VO_2 kinetics during moderate-intensity exercise as markers of lower metabolic stability and lower exercise tolerance. Eur J Appl Physiol 111:345–355. doi: 10.1007/s00421-010-1609-1

Green D (2013) Enhanced conduit artery flow-mediated dilation in elite athletes: false or reality? Author reply. Med Sci Sports Exerc 45:1220. doi: 10.1249/MSS.0b013e31828d6016

Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, et al (2005) Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. J Physiol 562:617–628. doi: 10.1113/jphysiol.2004.075929

Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HMM, et al (2014) Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. Hypertension 1979 63:376–382. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02044

Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R (2004a) Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. J Physiol 561:1–25. doi: 10.1113/jphysiol.2004.068197

Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R (2004b) Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. J Physiol 561:1–25. doi: 10.1113/jphysiol.2004.068197

Green DJ, Spence A, Rowley N, et al (2012) Vascular adaptation in athletes: is there an "athlete's artery"? Exp Physiol 97:295–304. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058826

Green DJ, Walsh JH, Maiorana A, et al (2004c) Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: effects of exercise training. J Appl Physiol 97:749–755; discussion 748. doi: 10.1152/japplphysiol.00109.2004

Guo L, Fang P, Yu M, et al (2014) Central alarin ameliorated insulin resistance of adipocytes in type 2 diabetic rats. J Endocrinol 223:217–225. doi: 10.1530/JOE-14-0102

Haas TL, Lloyd PG, Yang H-T, Terjung RL (2012) Exercise training and peripheral arterial disease. Compr Physiol 2:2933–3017. doi: 10.1002/cphy.c110065

Haider G, Folland JP (2014) Nitrate supplementation enhances the contractile properties of human skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc 46:2234–2243. doi: 10.1249/MSS.0000000000000351

Halseth AE, Bracy DP, Wasserman DH (1998) Limitations to exercise- and maximal insulin-stimulated muscle glucose uptake. J Appl Physiol 85:2305–2313

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. Circulation 107:3152–3158. doi: 10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C

Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, et al (1998) Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. Circulation 98:2709–2715

Hambrecht R, Gielen S, Linke A, et al (2000) Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. JAMA 283:3095–3101

Hanssen H, Nickel T, Drexel V, et al (2011) Exercise-induced alterations of retinal vessel diameters and cardiovascular risk reduction in obesity. Atherosclerosis 216:433–439. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.009

Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, et al (2009) Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. Cardiovasc Res 81:723–732. doi: 10.1093/cvr/cvn332

Harper AJ, Ferreira LF, Lutjemeier BJ, et al (2006) Human femoral artery and estimated muscle capillary blood flow kinetics following the onset of exercise. Exp Physiol 91:661–671. doi: 10.1113/expphysiol.2005.032904

Haseler LJ, Hogan MC, Richardson RS (1999) Skeletal muscle phosphocreatine recovery in exercise-trained humans is dependent on O2 availability. J Appl Physiol 86:2013–2018

Hashimoto S, Kobayashi A (2003) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyceryl trinitrate and its metabolites. Clin Pharmacokinet 42:205–221. doi: 10.2165/00003088-200342030-00001

Hellsten Y, Nyberg M (2015) Cardiovascular Adaptations to Exercise Training. Compr Physiol 6:1–32. doi: 10.1002/cphy.c140080

Hernández A, Schiffer TA, Ivarsson N, et al (2012) Dietary nitrate increases tetanic [Ca2+]i and contractile force in mouse fast-twitch muscle. J Physiol 590:3575–3583. doi: 10.1113/jphysiol.2012.232777

Hickner RC, Fisher JS, Ehsani AA, Kohrt WM (1997) Role of nitric oxide in skeletal muscle blood flow at rest and during dynamic exercise in humans. Am J Physiol 273:H405-410

Hirai T, Visneski MD, Kearns KJ, et al (1994) Effects of NO synthase inhibition on the muscular blood flow response to treadmill exercise in rats. J Appl Physiol 77:1288–1293

Hon YY, Lin EE, Tian X, et al (2016) Increased consumption and vasodilatory effect of nitrite during exercise. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 310:L354-364. doi: 10.1152/ajplung.00081.2015

Hoon MW, Johnson NA, Chapman PG, Burke LM (2013) The effect of nitrate supplementation on exercise performance in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. Int J Sport Nutr Exerc Metab 23:522–532

Hoon MW, Jones AM, Johnson NA, et al (2014) The effect of variable doses of inorganic nitrate-rich beetroot juice on simulated 2,000-m rowing performance in trained athletes. Int J Sports Physiol Perform 9:615–620. doi: 10.1123/ijspp.2013-0207

Hopker J, Passfield L, Coleman D, et al (2009) The effects of training on gross efficiency in cycling: a review. Int J Sports Med 30:845–850. doi: 10.1055/s-0029-1237712

Hornig B, Maier V, Drexler H (1996) Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. Circulation 93:210–214

Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, et al (2007) Nitric oxide synthase type-1 modulates cardiomyocyte contractility and calcium handling: association with low intrinsic aerobic capacity. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 14:319–325. doi: 10.1097/HJR.0b013e3280128bef

Hsu A, Heshka S, Janumala I, et al (2003) Larger mass of high-metabolic-rate organs does not explain higher resting energy expenditure in children. Am J Clin Nutr 77:1506–1511

Hughey CC, Hittel DS, Johnsen VL, Shearer J (2011) Hyperinsulinemic-euglycemic clamp in the conscious rat. J Vis Exp. doi: 10.3791/2432

Huonker M, Schmid A, Schmidt-Trucksass A, et al (2003) Size and blood flow of central and peripheral arteries in highly trained able-bodied and disabled athletes. J Appl Physiol 95:685–691. doi: 10.1152/japplphysiol.00710.2001

Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR (2010) Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. Int J Cardiovasc Imaging 26:631–640. doi: 10.1007/s10554-010-9616-1

Jensen FB (2009) The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. Biochim Biophys Acta 1787:841–848. doi: 10.1016/j.bbabio.2009.02.010

Jensen L, Bangsbo J, Hellsten Y (2004) Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. J Physiol 557:571–582. doi: 10.1113/jphysiol.2003.057711

Jones AM (2014) Dietary nitrate supplementation and exercise performance. Sports Med 44 Suppl 1:S35-45. doi: 10.1007/s40279-014-0149-y

Jones AM, Carter H (2000) The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. Sports Med 29:373–386

Jones AM, Ferguson SK, Bailey SJ, et al (2016) Fiber Type-Specific Effects of Dietary Nitrate. Exerc Sport Sci Rev 44:53–60. doi: 10.1249/JES.0000000000000074

Jones AM, Poole DC (2005) Oxygen uptake dynamics: from muscle to mouth--an introduction to the symposium. Med Sci Sports Exerc 37:1542–1550

Joyner MJ, Casey DP (2015) Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. Physiol Rev 95:549–601. doi: 10.1152/physrev.00035.2013

Joyner MJ, Green DJ (2009) Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. J Physiol 587:5551–5558. doi: 10.1113/jphysiol.2009.179432

Jungersten L, Ambring A, Wall B, Wennmalm A (1997) Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. J Appl Physiol 82:760–764

Kajimoto H, Kai H, Aoki H, et al (2012) Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. Kidney Int 81:762–768. doi: 10.1038/ki.2011.476

Kakimoto Y, Akazawa S (1970) Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. J Biol Chem 245:5751–5758

Kalliokoski KK, Oikonen V, Takala TO, et al (2001) Enhanced oxygen extraction and reduced flow heterogeneity in exercising muscle in endurance-trained men. Am J Physiol Endocrinol Metab 280:E1015-1021

Kamga C, Krishnamurthy S, Shiva S (2012) Myoglobin and mitochondria: a relationship bound by oxygen and nitric oxide. Nitric Oxide 26:251–258. doi: 10.1016/j.niox.2012.03.005

Kapur S, Bédard S, Marcotte B, et al (1997) Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. Diabetes 46:1691–1700

Kayacelebi AA, Langen J, Weigt-Usinger K, et al (2015) Biosynthesis of homoarginine (hArg) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) from acutely and chronically administered free L-arginine in humans. Amino Acids 47:1893–1908. doi: 10.1007/s00726-015-2012-3

Kelly J, Fulford J, Vanhatalo A, et al (2013a) Effects of short-term dietary nitrate supplementation on blood pressure, O2 uptake kinetics, and muscle and cognitive function in older adults. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 304:R73-83. doi: 10.1152/ajpregu.00406.2012

Kelly J, Vanhatalo A, Wilkerson DP, et al (2013b) Effects of nitrate on the power-duration relationship for severe-intensity exercise. Med Sci Sports Exerc 45:1798–1806. doi: 10.1249/MSS.0b013e31828e885c

Kenjale AA, Ham KL, Stabler T, et al (2011) Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. J Appl Physiol 110:1582–1591. doi: 10.1152/japplphysiol.00071.2011

Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, et al (2004) Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. Circulation 109:172–177. doi: 10.1161/01.CIR.0000105764.22626.B1

Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT (2006) Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:697–705. doi: 10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a

King-Vanvlack CE, Curtis SE, Mewburn JD, et al (1995) Role of endothelial factors in active hyperemic responses in contracting canine muscle. J Appl Physiol 79:107–112

Kingwell BA, Formosa M, Muhlmann M, et al (2002) Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type 2 diabetes more than in control subjects. Diabetes 51:2572–2580

Koch LG, Britton SL (2001) Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. Physiol Genomics 5:45–52

Koch LG, Britton SL (2008) Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. J Physiol 586:83–95. doi: 10.1113/jphysiol.2007.144709

Koch LG, Britton SL, Wisløff U (2012) A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. Trends Cardiovasc Med 22:29–34. doi: 10.1016/j.tcm.2012.06.007

Koch LG, Kemi OJ, Qi N, et al (2011) Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. Circ Res 109:1162–1172. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253807

Koch LG, Pollott GE, Britton SL (2013) Selectively bred rat model system for low and high response to exercise training. Physiol Genomics 45:606–614. doi: 10.1152/physiolgenomics.00021.2013

Koller A, Bagi Z (2002) On the role of mechanosensitive mechanisms eliciting reactive hyperemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283:H2250-2259. doi: 10.1152/ajpheart.00545.2002

Koller A, Huang A, Sun D, Kaley G (1995) Exercise training augments flow-dependent dilation in rat skeletal muscle arterioles. Role of endothelial nitric oxide and prostaglandins. Circ Res 76:544–550

Koncsos P, Seres I, Harangi M, et al (2011) Favorable effect of short-term lifestyle intervention on human paraoxonase-1 activity and adipokine levels in childhood obesity. J Am Coll Nutr 30:333–339

Kraemer MD, Kubo SH, Rector TS, et al (1993) Pulmonary and peripheral vascular factors are important determinants of peak exercise oxygen uptake in patients with heart failure. J Am Coll Cardiol 21:641–648

Krustrup P, Söderlund K, Mohr M, Bangsbo J (2004) The slow component of oxygen uptake during intense, sub-maximal exercise in man is associated with additional fibre recruitment. Pflugers Arch 447:855–866. doi: 10.1007/s00424-003-1203-z

Kuga T, Mohri M, Egashira K, et al (1997) Bradykinin-induced vasodilation of human coronary arteries in vivo: role of nitric oxide and angiotensin-converting enzyme. J Am Coll Cardiol 30:108–112

Lalande S, Gusso S, Hofman PL, Baldi JC (2008) Reduced leg blood flow during submaximal exercise in type 2 diabetes. Med Sci Sports Exerc 40:612–617. doi: 10.1249/MSS.0b013e318161aa99

Lamontagne D, Pohl U, Busse R (1992) Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. Circ Res 70:123–130

Langberg H, Bjørn C, Boushel R, et al (2002) Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. J Physiol 542:977–983

Langille BL, O'Donnell F (1986) Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. Science 231:405–407

Lansley KE, Winyard PG, Bailey SJ, et al (2011a) Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. Med Sci Sports Exerc 43:1125–1131. doi: 10.1249/MSS.0b013e31821597b4

Lansley KE, Winyard PG, Fulford J, et al (2011b) Dietary nitrate supplementation reduces the O2 cost of walking and running: a placebo-controlled study. J Appl Physiol 110:591–600. doi: 10.1152/japplphysiol.01070.2010

Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, et al (2011a) Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. Cell Metab 13:149–159. doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.004

Larsen FJ, Schiffer TA, Ekblom B, et al (2014) Dietary nitrate reduces resting metabolic rate: a randomized, crossover study in humans. Am J Clin Nutr 99:843–850. doi: 10.3945/ajcn.113.079491

Larsen FJ, Schiffer TA, Sahlin K, et al (2011b) Mitochondrial oxygen affinity predicts basal metabolic rate in humans. FASEB J 25:2843–2852. doi: 10.1096/fj.11-182139

Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B (2007) Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. Acta Physiol 191:59–66. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01713.x

Laughlin MH (1987) Skeletal muscle blood flow capacity: role of muscle pump in exercise hyperemia. Am J Physiol 253:H993-1004

Lee-Young RS, Ayala JE, Hunley CF, et al (2010) Endothelial nitric oxide synthase is central to skeletal muscle metabolic regulation and enzymatic signaling during exercise in vivo. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298:R1399-1408. doi: 10.1152/ajpregu.00004.2010

Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, et al (1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. Biochem J 343 Pt 1:209–214

Lessard SJ, Rivas DA, Alves-Wagner AB, et al (2013) Resistance to aerobic exercise training causes metabolic dysfunction and reveals novel exercise-regulated signaling networks. Diabetes 62:2717–2727. doi: 10.2337/db13-0062

Levine AB, Punihaole D, Levine TB (2012) Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. Cardiology 122:55–68. doi: 10.1159/000338150

Levine BD, Lane LD, Buckey JC, et al (1991) Left ventricular pressure-volume and Frank-Starling relations in endurance athletes. Implications for orthostatic tolerance and exercise performance. Circulation 84:1016–1023

Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al (2009) The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. PLoS Med 6:e1000100. doi: 10.1371/journal.pmed.1000100

Liu JL, Murakami H, Zucker IH (1998) Angiotensin II-nitric oxide interaction on sympathetic outflow in conscious rabbits. Circ Res 82:496–502

Liu X, Hou L, Xu D, et al (2016) Effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on heart failure development. Nitric Oxide 54:73–81. doi: 10.1016/j.niox.2016.02.006

Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL (2001) Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281:H2528-2538

Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, et al (2009) Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. Nat Chem Biol 5:865–869. doi: 10.1038/nchembio.260

Lundberg JO, Govoni M (2004) Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. Free Radic Biol Med 37:395–400. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027

Lundberg JO, Weitzberg E (2010) NO-synthase independent NO generation in mammals. Biochem Biophys Res Commun 396:39–45. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.136

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nat Rev Drug Discov 7:156–167. doi: 10.1038/nrd2466

Maas R, Böger RH (2003) Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. Atheroscler Suppl 4:5–17. doi: 10.1016/S1567-5688(03)00028-X

Machha A, Schechter AN (2011) Dietary nitrite and nitrate: a review of potential mechanisms of cardiovascular benefits. Eur J Nutr 50:293–303. doi: 10.1007/s00394-011-0192-5

MacLeod KE, Nugent SF, Barr SI, et al (2015) Acute Beetroot Juice Supplementation Does Not Improve Cycling Performance in Normoxia or Moderate Hypoxia. Int J Sport Nutr Exerc Metab 25:359–366. doi: 10.1123/ijsnem.2014-0129

Maeda S, Miyaki A, Kumagai H, et al (2013) Lifestyle modification decreases arterial stiffness and plasma asymmetric dimethylarginine level in overweight and obese men. Coron Artery Dis 24:583–588. doi: 10.1097/MCA.0b013e3283647a99

Maiorana A, O'Driscoll G, Cheetham C, et al (2001a) The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. J Am Coll Cardiol 38:860–866

Maiorana A, O'Driscoll G, Dembo L, et al (2001b) Exercise training, vascular function, and functional capacity in middle-aged subjects. Med Sci Sports Exerc 33:2022–2028

Maiorana A, O'Driscoll G, Dembo L, et al (2000) Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279:H1999-2005

Maltais F, Simard AA, Simard C, et al (1996) Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. Am J Respir Crit Care Med 153:288–293. doi: 10.1164/ajrccm.153.1.8542131

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM (2007) Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 851:30–41. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.038

Martens-Lobenhoffer J, Surdacki A, Bode-Böger SM (2013) Fast and Precise Quantification of l-Homoarginine in Human Plasma by HILIC-Isotope Dilution-MS–MS. Chromatographia 76:1755–1759. doi: 10.1007/s10337-013-2561-0

Martin EA, Nicholson WT, Eisenach JH, et al (2006) Bimodal distribution of vasodilator responsiveness to adenosine due to difference in nitric oxide contribution: implications for exercise hyperemia. J Appl Physiol 101:492–499. doi: 10.1152/japplphysiol.00684.2005

Martin K, Smee D, Thompson KG, Rattray B (2014) No improvement of repeated-sprint performance with dietary nitrate. Int J Sports Physiol Perform 9:845–850. doi: 10.1123/ijspp.2013-0384

Masschelein E, Van Thienen R, Wang X, et al (2012) Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. J Appl Physiol 113:736–745. doi: 10.1152/japplphysiol.01253.2011

Maxwell AJ, Schauble E, Bernstein D, Cooke JP (1998) Limb blood flow during exercise is dependent on nitric oxide. Circulation 98:369–374

McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. J Biol Chem 275:6123–6128

McConell GK, Bradley SJ, Stephens TJ, et al (2007) Skeletal muscle nNOS mu protein content is increased by exercise training in humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 293:R821-828. doi: 10.1152/ajpregu.00796.2006

McDonough P, Behnke BJ, Padilla DJ, et al (2005) Control of microvascular oxygen pressures in rat muscles comprised of different fibre types. J Physiol 563:903–913. doi: 10.1113/jphysiol.2004.079533

McLenachan JM, Williams JK, Fish RD, et al (1991) Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis. Circulation 84:1273–1278

Michel T (2013) R is for arginine: metabolism of arginine takes off again, in new directions. Circulation 128:1400–1404. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005924

Milsom AB, Fernandez BO, Garcia-Saura MF, et al (2012) Contributions of nitric oxide synthases, dietary nitrite/nitrate, and other sources to the formation of NO signaling products. Antioxid Redox Signal 17:422–432. doi: 10.1089/ars.2011.4156

Mittermayer F, Pleiner J, Krzyzanowska K, et al (2005) Regular physical exercise normalizes elevated asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. Wien Klin Wochenschr 117:816–820. doi: 10.1007/s00508-005-0476-y

Modin A, Björne H, Herulf M, et al (2001) Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation: Non-enzymatic NO production. Acta Physiol Scand 171:9–16. doi: 10.1046/j.1365-201X.2001.00771.x

Montero D (2015) The association of cardiorespiratory fitness with endothelial or smooth muscle vasodilator function. Eur J Prev Cardiol 22:1200–1211. doi: 10.1177/2047487314553780

Montero D, Obert P, Walther G (2013) Enhanced conduit artery flow-mediated dilation in elite athletes: false or reality? [corrected]. Med Sci Sports Exerc 45:1219. doi: 10.1249/MSS.0b013e31828d5ffc

Montero D, Padilla J, Diaz-Cañestro C, et al (2014) Flow-mediated dilation in athletes: influence of aging. Med Sci Sports Exerc 46:2148–2158. doi: 10.1249/MSS.0000000000000341

Montero D, Walther G, Diaz-Cañestro C, et al (2015) Microvascular Dilator Function in Athletes: A Systematic Review and Meta-analysis. Med Sci Sports Exerc 47:1485–1494. doi: 10.1249/MSS.0000000000000567

Morales Y, Cáceres T, May K, Hevel JM (2016) Biochemistry and regulation of the protein arginine methyltransferases (PRMTs). Arch Biochem Biophys 590:138–152. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.030

Mortensen SP, Damsgaard R, Dawson EA, et al (2008) Restrictions in systemic and locomotor skeletal muscle perfusion, oxygen supply and VO2 during high-intensity whole-body exercise in humans. J Physiol 586:2621–2635. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149401

Mortensen SP, Dawson EA, Yoshiga CC, et al (2005) Limitations to systemic and locomotor limb muscle oxygen delivery and uptake during maximal exercise in humans. J Physiol 566:273–285. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086025

Mortensen SP, González-Alonso J, Bune LT, et al (2009) ATP-induced vasodilation and purinergic receptors in the human leg: roles of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296:R1140-1148. doi: 10.1152/ajpregu.90822.2008

Mortensen SP, Svendsen JH, Ersbøll M, et al (2013) Skeletal muscle signaling and the heart rate and blood pressure response to exercise: insight from heart rate pacing during exercise with a trained and a deconditioned muscle group. Hypertension 1979 61:1126–1133. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00328

Muggeridge DJ, Howe CCF, Spendiff O, et al (2013) The effects of a single dose of concentrated beetroot juice on performance in trained flatwater kayakers. Int J Sport Nutr Exerc Metab 23:498–506

Muggeridge DJ, Howe CCF, Spendiff O, et al (2014) A single dose of beetroot juice enhances cycling performance in simulated altitude. Med Sci Sports Exerc 46:143–150. doi: 10.1249/MSS.0b013e3182a1dc51

Murias JM, Spencer MD, Kowalchuk JM, Paterson DH (2011) Influence of phase I duration on phase II VO2 kinetics parameter estimates in older and young adults. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301:R218-224. doi: 10.1152/ajpregu.00060.2011

Murphy MN, Mizuno M, Mitchell JH, Smith SA (2011) Cardiovascular regulation by skeletal muscle reflexes in health and disease. Am J Physiol Heart Circ Physiol 301:H1191-1204. doi: 10.1152/ajpheart.00208.2011

Murrant CL, Sarelius IH (2000) Coupling of muscle metabolism and muscle blood flow in capillary units during contraction. Acta Physiol Scand 168:531–541. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00706.x

Murrant CL, Sarelius IH (2015) Local control of blood flow during active hyperaemia: what kinds of integration are important? J Physiol 593:4699–4711. doi: 10.1113/JP270205

Musch TI, Bruno A, Bradford GE, et al (1988) Measurements of metabolic rate in rats: a comparison of techniques. J Appl Physiol 65:964–970

Musch TI, McAllister RM, Symons JD, et al (2001) Effects of nitric oxide synthase inhibition on vascular conductance during high speed treadmill exercise in rats. Exp Physiol 86:749–757

Myers J, Kaykha A, George S, et al (2004) Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. Am J Med 117:912–918. doi: 10.1016/j.amjmed.2004.06.047

Myers J, Prakash M, Froelicher V, et al (2002) Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. N Engl J Med 346:793–801. doi: 10.1056/NEJMoa011858

Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, et al (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. FEBS Lett 316:175–180

Naylor LH, Weisbrod CJ, O'Driscoll G, Green DJ (2005) Measuring peripheral resistance and conduit arterial structure in humans using Doppler ultrasound. J Appl Physiol 98:2311–2315. doi: 10.1152/japplphysiol.01047.2004

Nicholson WT, Vaa B, Hesse C, et al (2009) Aging is associated with reduced prostacyclin-mediated dilation in the human forearm. Hypertension 1979 53:973–978. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.121483

Niebauer J, Clark AL, Webb-Peploe KM, et al (2005) Home-based exercise training modulates pro-oxidant substrates in patients with chronic heart failure. Eur J Heart Fail 7:183–188. doi: 10.1016/j.ejheart.2004.06.001

Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, et al (1999) Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. Am J Physiol 276:H1346-1354

Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MPC, et al (2003) The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). Clin Nutr 22:17–22

Nohl H, Staniek K, Sobhian B, et al (2000) Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. Acta Biochim Pol 47:913–921

Notay K, Incognito AV, Millar PJ (2017) Acute beetroot juice supplementation on sympathetic nerve activity: a randomized, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept study. Am J Physiol Heart Circ Physiol 313:H59–H65. doi: 10.1152/ajpheart.00163.2017

Nyakayiru J, Jonvik KL, Trommelen J, et al (2017a) Beetroot Juice Supplementation Improves High-Intensity Intermittent Type Exercise Performance in Trained Soccer Players. Nutrients 9:. doi: 10.3390/nu9030314

Nyakayiru J, Kouw IWK, Cermak NM, et al (2017b) Sodium nitrate ingestion increases skeletal muscle nitrate content in humans. J Appl Physiol 123:637–644. doi: 10.1152/japplphysiol.01036.2016

Nyakayiru JM, Jonvik KL, Pinckaers PJM, et al (2017c) No Effect of Acute and 6-Day Nitrate Supplementation on VO2 and Time-Trial Performance in Highly Trained Cyclists. Int J Sport Nutr Exerc Metab 27:11–17. doi: 10.1123/ijsnem.2016-0034

Nybäck L, Glännerud C, Larsson G, et al (2017) Physiological and performance effects of nitrate supplementation during roller-skiing in normoxia and normobaric hypoxia. Nitric Oxide 70:1–8. doi: 10.1016/j.niox.2017.08.001

Nyberg M, Jensen LG, Thaning P, et al (2012) Role of nitric oxide and prostanoids in the regulation of leg blood flow and blood pressure in humans with essential hypertension: effect of high-intensity aerobic training. J Physiol 590:1481–1494. doi: 10.1113/jphysiol.2011.225136

Osada T, Katsumura T, Hamaoka T, et al (1999) Reduced blood flow in abdominal viscera measured by Doppler ultrasound during one-legged knee extension. J Appl Physiol 86:709–719

Palmieri EA, Palmieri V, Innelli P, et al (2005) Aerobic exercise performance correlates with post-ischemic flow-mediated dilation of the brachial artery in young healthy men. Eur J Appl Physiol 94:113–117. doi: 10.1007/s00421-004-1285-0

Palomo I, Contreras A, Alarcón LM, et al (2011) Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome. Nitric Oxide 24:224–228. doi: 10.1016/j.niox.2011.03.002

Pawlak-Chaouch M, Boissière J, Gamelin FX, et al (2016) Effect of dietary nitrate supplementation on metabolic rate during rest and exercise in human: A systematic review and a meta-analysis. Nitric Oxide 53:65–76. doi: 10.1016/j.niox.2016.01.001

Peacock O, Tjønna AE, James P, et al (2012) Dietary nitrate does not enhance running performance in elite cross-country skiers. Med Sci Sports Exerc 44:2213–2219. doi: 10.1249/MSS.0b013e3182640f48

Piknova B, Park JW, Swanson KM, et al (2015) Skeletal muscle as an endogenous nitrate reservoir. Nitric Oxide 47:10–16. doi: 10.1016/j.niox.2015.02.145

Pilz S, Meinitzer A, Gaksch M, et al (2015) Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. Amino Acids 47:1703–1713. doi: 10.1007/s00726-015-1993-2

Pipp F, Boehm S, Cai W-J, et al (2004) Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1664–1668. doi: 10.1161/01.ATV.0000138028.14390.e4

Pohl U, De Wit C, Gloe T (2000) Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. Acta Physiol Scand 168:505–510. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00702.x

Poole DC, Hirai DM, Copp SW, Musch TI (2012) Muscle oxygen transport and utilization in heart failure: implications for exercise (in)tolerance. Am J Physiol Heart Circ Physiol 302:H1050-1063. doi: 10.1152/ajpheart.00943.2011

Pope AJ, Karuppiah K, Cardounel AJ (2009) Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. Pharmacol Res 60:461–465. doi: 10.1016/j.phrs.2009.07.016

Porcelli S, Pugliese L, Rejc E, et al (2016) Effects of a Short-Term High-Nitrate Diet on Exercise Performance. Nutrients 8:. doi: 10.3390/nu8090534

Porcelli S, Ramaglia M, Bellistri G, et al (2015) Aerobic Fitness Affects the Exercise Performance Responses to Nitrate Supplementation. Med Sci Sports Exerc 47:1643–1651. doi: 10.1249/MSS.0000000000000577

Powers SK, Lawler J, Dempsey JA, et al (1989) Effects of incomplete pulmonary gas exchange on VO2 max. J Appl Physiol 66:2491–2495

Puype J, Ramaekers M, Van Thienen R, et al (2015) No effect of dietary nitrate supplementation on endurance training in hypoxia. Scand J Med Sci Sports 25:234–241. doi: 10.1111/sms.12199

Rådegran G, Saltin B (2000) Human femoral artery diameter in relation to knee extensor muscle mass, peak blood flow, and oxygen uptake. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278:H162-167

Raven PB (2008) Recent advances in baroreflex control of blood pressure during exercise in humans: an overview. Med Sci Sports Exerc 40:2033–2036. doi: 10.1249/MSS.0b013e318180bc41

Reinecke NL, Cunha TM, Heilberg IP, et al (2014) Exercise capacity in polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis 64:239–246. doi: 10.1053/j.ajkd.2014.03.014

Ren Y-Y, Overmyer KA, Qi NR, et al (2013) Genetic analysis of a rat model of aerobic capacity and metabolic fitness. PloS One 8:e77588. doi: 10.1371/journal.pone.0077588

Riccioni G, Scotti L, Guagnano MT, et al (2015) Physical exercise reduces synthesis of ADMA, SDMA, and L-Arg. Front Biosci 7:417–422

Richter B, Niessner A, Penka M, et al (2005) Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. Thromb Haemost 94:1306–1311. doi: 10.1160/TH05-03-0158

Richter EA, Hargreaves M (2013) Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. Physiol Rev 93:993–1017. doi: 10.1152/physrev.00038.2012

Rinder MR, Spina RJ, Ehsani AA (2000) Enhanced endothelium-dependent vasodilation in older endurance-trained men. J Appl Physiol 88:761–766

Rodionov RN, Martens-Lobenhoffer J, Brilloff S, et al (2014) Role of alanine:glyoxylate aminotransferase 2 in metabolism of asymmetric dimethylarginine in the settings of asymmetric dimethylarginine overload and bilateral nephrectomy. Nephrol Dial Transplant 29:2035–2042. doi: 10.1093/ndt/gfu236

Rose AJ, Richter EA (2005) Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? Physiology 20:260–270. doi: 10.1152/physiol.00012.2005

Ross RM, Wadley GD, Clark MG, et al (2007) Local nitric oxide synthase inhibition reduces skeletal muscle glucose uptake but not capillary blood flow during in situ muscle contraction in rats. Diabetes 56:2885–2892. doi: 10.2337/db07-0745

Rowley NJ, Dawson EA, Hopman MTE, et al (2012) Conduit diameter and wall remodeling in elite athletes and spinal cord injury. Med Sci Sports Exerc 44:844–849. doi: 10.1249/MSS.0b013e31823f6887

Rywik TM, Blackman MR, Yataco AR, et al (1999) Enhanced endothelial vasoreactivity in endurance-trained older men. J Appl Physiol 87:2136–2142

Saito Y, Eraslan A, Hester RL (1994) Role of EDRFs in the control of arteriolar diameter during increased metabolism of striated muscle. Am J Physiol 267:H195-200

Saltin B (1988) Capacity of blood flow delivery to exercising skeletal muscle in humans. Am J Cardiol 62:30E–35E

Saltin B, Strange S (1992) Maximal oxygen uptake: “old” and “new” arguments for a cardiovascular limitation. Med Sci Sports Exerc 24:30–37

Sandbakk SB, Sandbakk Ø, Peacock O, et al (2015) Effects of acute supplementation of L-arginine and nitrate on endurance and sprint performance in elite athletes. Nitric Oxide 48:10–15. doi: 10.1016/j.niox.2014.10.006

Sarelius I, Pohl U (2010) Control of muscle blood flow during exercise: local factors and integrative mechanisms. Acta Physiol 199:349–365. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02129.x

Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, et al (2011) Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. Atherosclerosis 217:240–248. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.018

Schmidt-Trucksäss A, Schmid A, Dörr B, Huonker M (2003) The relationship of left ventricular to femoral artery structure in male athletes. Med Sci Sports Exerc 35:214–219; discussion 220. doi: 10.1249/01.MSS.0000048637.26711.93

Schrage WG, Joyner MJ, Dinenno FA (2004) Local inhibition of nitric oxide and prostaglandins independently reduces forearm exercise hyperaemia in humans. J Physiol 557:599–611. doi: 10.1113/jphysiol.2004.061283

Schulze F, Lenzen H, Hanefeld C, et al (2006) Asymmetric dimethylarginine is an independent risk factor for coronary heart disease: results from the multicenter Coronary Artery Risk Determination investigating the Influence of ADMA Concentration (CARDIAC) study. Am Heart J 152:493.e1-8. doi: 10.1016/j.ahj.2006.06.005

Schulze F, Maas R, Freese R, et al (2005) Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. Eur J Clin Invest 35:622–626. doi: 10.1111/j.1365-2362.2005.01561.x

Schwedhelm E, Xanthakis V, Maas R, et al (2011) Plasma symmetric dimethylarginine reference limits from the Framingham offspring cohort. Clin Chem Lab Med 49:1907–1910. doi: 10.1515/CCLM.2011.679

Sciacqua A, Grillo N, Quero M, et al (2012) Asymmetric Dimethylarginine Plasma Levels and Endothelial Function in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Patients. Int J Mol Sci 13:13804–13815. doi: 10.3390/ijms131113804

Seals DR, Moreau KL, Gates PE, Eskurza I (2006) Modulatory influences on ageing of the vasculature in healthy humans. Exp Gerontol 41:501–507. doi: 10.1016/j.exger.2006.01.001

Seljeflot I, Nilsson BB, Westheim AS, et al (2011) The L-arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is strongly related to the severity of chronic heart failure. No effects of exercise training. J Card Fail 17:135–142. doi: 10.1016/j.cardfail.2010.09.003

Servillo L, Giovane A, Cautela D, et al (2013) The methylarginines NMMA, ADMA, and SDMA are ubiquitous constituents of the main vegetables of human nutrition. Nitric Oxide 30:43–48. doi: 10.1016/j.niox.2013.02.080

Shan L, Wang B, Gao G, et al (2013) L-Arginine supplementation improves antioxidant defenses through L-arginine/nitric oxide pathways in exercised rats. J Appl Physiol 115:1146–1155. doi: 10.1152/japplphysiol.00225.2013

Shannon OM, Duckworth L, Barlow MJ, et al (2016) Dietary nitrate supplementation enhances high-intensity running performance in moderate normobaric hypoxia, independent of aerobic fitness. Nitric Oxide 59:63–70. doi: 10.1016/j.niox.2016.08.001

Shepherd AI, Wilkerson DP, Dobson L, et al (2015) The effect of dietary nitrate supplementation on the oxygen cost of cycling, walking performance and resting blood pressure in individuals with chronic obstructive pulmonary disease: A double blind placebo controlled, randomised control trial. Nitric Oxide 48:31–37. doi: 10.1016/j.niox.2015.01.002

Sheriff DD (2010) Role of mechanical factors in governing muscle blood flow. Acta Physiol 199:385–391. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02120.x

Shin S, Fung S-M, Mohan S, Fung H-L (2011) Simultaneous bioanalysis of L-arginine, L-citrulline, and dimethylarginines by LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 879:467–474. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.01.006

Shirakawa T, Kako K, Shimada T, et al (2011) Production of free methylarginines via the proteasome and autophagy pathways in cultured cells. Mol Med Rep 4:615–620. doi: 10.3892/mmr.2011.488

Shiva S (2010) Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. Nitric Oxide 22:64–74. doi: 10.1016/j.niox.2009.09.002

Shiva S, Huang Z, Grubina R, et al (2007) Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. Circ Res 100:654–661. doi: 10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b

Singel DJ, Stamler JS (2005) Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. Annu Rev Physiol 67:99–145. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.060603.090918

Sinoway LI, Musch TI, Minotti JR, Zelis R (1986) Enhanced maximal metabolic vasodilatation in the dominant forearms of tennis players. J Appl Physiol 61:673–678

Sinoway LI, Shenberger J, Wilson J, et al (1987) A 30-day forearm work protocol increases maximal forearm blood flow. J Appl Physiol 62:1063–1067

Snell PG, Martin WH, Buckey JC, Blomqvist CG (1987) Maximal vascular leg conductance in trained and untrained men. J Appl Physiol 62:606–610

Sobko T, Reinders C, Norin E, et al (2004) Gastrointestinal nitric oxide generation in germ-free and conventional rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:G993-997. doi: 10.1152/ajpgi.00203.2004

Spence AL, Carter HH, Naylor LH, Green DJ (2013) A prospective randomized longitudinal study involving 6 months of endurance or resistance exercise. Conduit artery adaptation in humans. J Physiol 591:1265–1275. doi: 10.1113/jphysiol.2012.247387

Spence AL, Naylor LH, Carter HH, et al (2011) A prospective randomised longitudinal MRI study of left ventricular adaptation to endurance and resistance exercise training in humans. J Physiol 589:5443–5452. doi: 10.1113/jphysiol.2011.217125

Sperandio PA, Oliveira MF, Rodrigues MK, et al (2012) Sildenafil improves microvascular O2 delivery-to-utilization matching and accelerates exercise O2 uptake kinetics in chronic heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 303:H1474-1480. doi: 10.1152/ajpheart.00435.2012

Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al (2002) Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. JAMA 287:1420–1426

Sydow K, Mondon CE, Cooke JP (2005) Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. Vasc Med 10 Suppl 1:S35-43. doi: 10.1177/1358836X0501000106

Takagi S, Murase N, Kime R, et al (2014) Skeletal muscle deoxygenation abnormalities in early post-myocardial infarction. Med Sci Sports Exerc 46:2062–2069. doi: 10.1249/MSS.0000000000000334

Tanahashi K, Akazawa N, Miyaki A, et al (2014a) Aerobic exercise training decreases plasma asymmetric dimethylarginine concentrations with increase in arterial compliance in postmenopausal women. Am J Hypertens 27:415–421. doi: 10.1093/ajh/hpt217

Tanahashi K, Akazawa N, Miyaki A, et al (2014b) Plasma ADMA concentrations associate with aerobic fitness in postmenopausal women. Life Sci 108:30–33. doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.003

Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS (2009) Cellular ADMA: regulation and action. Pharmacol Res 60:448–460. doi: 10.1016/j.phrs.2009.08.002

Teplan V, Mahrova A, Piťha J, et al (2014) Early exercise training after renal transplantation and asymmetric dimethylarginine: the effect of obesity. Kidney Blood Press Res 39:289–298. doi: 10.1159/000355806

Thijssen DHJ, Black MA, Pyke KE, et al (2011a) Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. Am J Physiol Heart Circ Physiol 300:H2-12. doi: 10.1152/ajpheart.00471.2010

Thijssen DHJ, Dawson EA, Black MA, et al (2008) Heterogeneity in conduit artery function in humans: impact of arterial size. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295:H1927-1934. doi: 10.1152/ajpheart.00405.2008

Thijssen DHJ, Rowley N, Padilla J, et al (2011b) Relationship between upper and lower limb conduit artery vasodilator function in humans. J Appl Physiol 111:244–250. doi: 10.1152/japplphysiol.00290.2011

Thomas GD, Zhang W, Victor RG (2001) Impaired modulation of sympathetic vasoconstriction in contracting skeletal muscle of rats with chronic myocardial infarctions: role of oxidative stress. Circ Res 88:816–823

Thompson C, Vanhatalo A, Jell H, et al (2016) Dietary nitrate supplementation improves sprint and high-intensity intermittent running performance. Nitric Oxide 61:55–61. doi: 10.1016/j.niox.2016.10.006

Thompson C, Wylie LJ, Fulford J, et al (2015) Dietary nitrate improves sprint performance and cognitive function during prolonged intermittent exercise. Eur J Appl Physiol 115:1825–1834. doi: 10.1007/s00421-015-3166-0

Thompson KG, Turner L, Prichard J, et al (2014) Influence of dietary nitrate supplementation on physiological and cognitive responses to incremental cycle exercise. Respir Physiol Neurobiol 193:11–20. doi: 10.1016/j.resp.2013.12.015

Timmers S, Konings E, Bilet L, et al (2011) Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. Cell Metab 14:612–622. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.002

Tinken TM, Thijssen DHJ, Hopkins N, et al (2010) Shear stress mediates endothelial adaptations to exercise training in humans. Hypertension 1979 55:312–318. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.146282

Toth J, Racz A, Kaminski PM, et al (2007) Asymmetrical dimethylarginine inhibits shear stress-induced nitric oxide release and dilation and elicits superoxide-mediated increase in arteriolar tone. Hypertension 1979 49:563–568. doi: 10.1161/01.HYP.0000256764.86208.3d

Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Rammos C, et al (2012) Higher endogenous nitrite levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes. Nitric Oxide 27:75–81. doi: 10.1016/j.niox.2012.05.003

Tronc F, Wassef M, Esposito B, et al (1996) Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16:1256–1262

Tschakovsky ME, Sheriff DD (2004) Immediate exercise hyperemia: contributions of the muscle pump vs. rapid vasodilation. J Appl Physiol 97:739–747. doi: 10.1152/japplphysiol.00185.2004

Tsikas D, Kayacelebi AA (2014) Do homoarginine and asymmetric dimethylarginine act antagonistically in the cardiovascular system? Circ J 78:2094–2095

Turiel M, Sitia S, Cicala S, et al (2011) Robotic treadmill training improves cardiovascular function in spinal cord injury patients. Int J Cardiol 149:323–329. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.02.010

Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, et al (2001) Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281:H1380-1389

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. Lancet 2:997–1000

Vallance P, Leiper J (2004) Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1023–1030. doi: 10.1161/01.ATV.0000128897.54893.26

Vallance P, Leone A, Calver A, et al (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet 339:572–575

Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, et al (2010) Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 299:R1121-1131. doi: 10.1152/ajpregu.00206.2010

Vanhatalo A, Fulford J, Bailey SJ, et al (2011) Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. J Physiol 589:5517–5528. doi: 10.1113/jphysiol.2011.216341

Vanhatalo A, Jones AM, Blackwell JR, et al (2014) Dietary nitrate accelerates postexercise muscle metabolic recovery and O2 delivery in hypoxia. J Appl Physiol 117:1460–1470. doi: 10.1152/japplphysiol.00096.2014

Vanin AF, Bevers LM, Slama-Schwok A, van Faassen EE (2007) Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. Cell Mol Life Sci 64:96–103. doi: 10.1007/s00018-006-6374-2

Vincent MA, Barrett EJ, Lindner JR, et al (2003) Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab 285:E123-129. doi: 10.1152/ajpendo.00021.2003

Walther G, Nottin S, Karpoff L, et al (2008) Flow-mediated dilation and exercise-induced hyperaemia in highly trained athletes: comparison of the upper and lower limb vasculature. Acta Physiol 193:139–150. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01834.x

Wang D, Gill PS, Chabrashvili T, et al (2007) Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular

endothelium-derived relaxing factor/NO. Circ Res 101:627–635. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.158915

Wang D, Strandgaard S, Borresen ML, et al (2008) Asymmetric dimethylarginine and lipid peroxidation products in early autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis 51:184–191. doi: 10.1053/j.ajkd.2007.09.020

Wasserman DH, Kang L, Ayala JE, et al (2011) The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. J Exp Biol 214:254–262. doi: 10.1242/jeb.048041

Webb A, Bond R, McLean P, et al (2004) Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. Proc Natl Acad Sci 101:13683–13688. doi: 10.1073/pnas.0402927101

Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, et al (2008) Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertension 1979 51:784–790. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523

Weibel ER, Hoppeler H (2005) Exercise-induced maximal metabolic rate scales with muscle aerobic capacity. J Exp Biol 208:1635–1644. doi: 10.1242/jeb.01548

Wethal T, Røysland R, Torbjørn O, Kjekshus J (2015) Exercise-induced vasodilation in healthy males: A marker of reduced endothelial function. Scand Cardiovasc J 49:123–129. doi: 10.3109/14017431.2015.1021708

Whipp BJ, Ward SA, Lamarra N, et al (1982) Parameters of ventilatory and gas exchange dynamics during exercise. J Appl Physiol 52:1506–1513

Whitfield J, Ludzki A, Heigenhauser GJF, et al (2016) Beetroot juice supplementation reduces whole body oxygen consumption but does not improve indices of mitochondrial efficiency in human skeletal muscle. J Physiol 594:421–435. doi: 10.1113/JP270844

Whyte JJ, Laughlin MH (2010) The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. Acta Physiol 199:441–450. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02127.x

Wilcken DEL, Sim AS, Wang J, Wang XL (2007) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. Mol Genet Metab 91:309–317; discussion 308. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.04.017

Williams PT (2001) Physical fitness and activity as separate heart disease risk factors: a meta-analysis. Med Sci Sports Exerc 33:754–761

Wilson AM, Shin DS, Weatherby C, et al (2010) Asymmetric dimethylarginine correlates with measures of disease severity, major adverse cardiovascular events and all-cause mortality in patients with peripheral arterial disease. Vasc Med 15:267–274. doi: 10.1177/1358863X10364552

Wisløff U, Bye A, Stølen T, et al (2015) Blunted cardiomyocyte remodeling response in exercise-resistant rats. J Am Coll Cardiol 65:1378–1380. doi: 10.1016/j.jacc.2015.01.041

Wisløff U, Najjar SM, Ellingsen O, et al (2005) Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. Science 307:418–420. doi: 10.1126/science.1108177

Womack L, Peters D, Barrett EJ, et al (2009) Abnormal skeletal muscle capillary recruitment during exercise in patients with type 2 diabetes mellitus and microvascular complications. J Am Coll Cardiol 53:2175–2183. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.042

Woodman CR, Schrage WG, Rush JW, et al (2001) Hindlimb unweighting decreases endothelium-dependent dilation and eNOS expression in soleus not gastrocnemius. J Appl Physiol 91:1091–1098

Wylie LJ, Bailey SJ, Kelly J, et al (2016a) Influence of beetroot juice supplementation on intermittent exercise performance. Eur J Appl Physiol 116:415–425. doi: 10.1007/s00421-015-3296-4

Wylie LJ, Kelly J, Bailey SJ, et al (2013a) Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. J Appl Physiol 115:325–336. doi: 10.1152/japplphysiol.00372.2013

Wylie LJ, Mohr M, Krustrup P, et al (2013b) Dietary nitrate supplementation improves team sport-specific intense intermittent exercise performance. Eur J Appl Physiol 113:1673–1684. doi: 10.1007/s00421-013-2589-8

Wylie LJ, Ortiz de Zevallos J, Isidore T, et al (2016b) Dose-dependent effects of dietary nitrate on the oxygen cost of moderate-intensity exercise: Acute vs. chronic supplementation. Nitric Oxide 57:30–39. doi: 10.1016/j.niox.2016.04.004

Ye F, Tao R, Cong W, et al (2008) Utilization of fluorescence tracer in hyperinsulinemic-euglycemic clamp test in mice. J Biochem Biophys Methods 70:978–984. doi: 10.1016/j.jprot.2008.01.003

Zamani P, Rawat D, Shiva-Kumar P, et al (2015) Effect of inorganic nitrate on exercise capacity in heart failure with preserved ejection fraction. Circulation 131:371–380; discussion 380. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012957

Zinker BA, Lacy DB, Bracy DP, Wasserman DH (1993) Role of glucose and insulin loads to the exercising limb in increasing glucose uptake and metabolism. J Appl Physiol 74:2915–2921

Zoladz JA, Korzeniewski B, Grassi B (2006) Training-induced acceleration of oxygen uptake kinetics in skeletal muscle: the underlying mechanisms. J Physiol Pharmacol 57 Suppl 10:67–84

Résumé :

Ce projet de thèse avait pour objet d'étudier la régulation de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) à travers la supplémentation en nitrate (NO_3^-) chez l'homme, et la perfusion d'ADMA chez l'animal. Nous avons essayé de déterminer les répercussions de la modulation de la biodisponibilité du NO sur la perfusion musculaire à l'exercice, et l'effet de l'aptitude aérobie sur cette modulation. Dans notre méta-analyse, nous avons rapporté une diminution de la consommation d'oxygène ($\dot{V}O_2$) lors d'exercices d'intensité modérée à élevée, avec une amélioration de la tolérance à l'exercice sans réduction du $\dot{V}O_2$ chez les sujets présentant une pathologie. Dans une seconde étude, aucune amélioration de la tolérance à l'effort n'a été observée chez des athlètes [consommation maximale d'oxygène ($\dot{V}O_{2max}$) > 65 mL.min^{-1}.kg^{-1}] au cours d'un exercice intermittent d'intensité supramaximale après une supplémentation en NO_3^- et sans modification au niveau du $\dot{V}O_2$ et de la perfusion musculaire. Une troisième étude montre que l'aptitude aérobie et l'apport en O_2 aux muscles, dépendante de la perfusion musculaire, ne sont pas associés à la concentration plasmatique d'ADMA chez des sujets jeunes et sains. Enfin, notre quatrième étude ne rapporte pas d'effet de la perfusion de l'ADMA sur la perfusion musculaire au cours d'un exercice de course chez des rats. En conclusion, la supplémentation en NO_3^- peut contribuer à une amélioration de la performance à travers une réduction du coût en O_2 pour des exercices sous-maximaux. Cependant, les sujets entraînés en endurance avec une aptitude aérobie élevée ne présentent ni d'effet ergogénique, ni d'amélioration de la perfusion musculaire à la suite d'une supplémentation en NO_3^- lors d'exercices intermittents supramaximaux, contrairement aux sujets modérément entraînés. En outre, l'ADMA, en tant inhibiteur de la synthèse du NO, ne semble pas jouer un rôle dans la régulation du débit sanguin et de l'apport en O_2 aux muscles actifs, en l'absence de conditions pathologiques.

Abstract:

We aimed to determine whether dietary nitrate (NO_3^-) supplementation and ADMA modulate NO bioavailability and muscle blood flow during exercise. The second purpose was to establish whether aerobic fitness alters the effects of dietary NO_3^- supplementation and ADMA on muscle blood flow during exercise. In our meta-analysis, we found that dietary NO_3^- supplementation decreases $\dot{V}O_2$ during exercise performed in the moderate and heavy intensity domains in healthy subjects, and enhances exercise tolerance in subjects with chronic diseases, but no change in $\dot{V}O_2$. Our second study showed that dietary NO_3^- supplementation did not increase the number of repetitions completed during supramaximal intensity intermittent exercise in endurance athletes with high aerobic fitness ($\dot{V}O_{2max}$ > 65 mL.kg^{-1}.min^{-1}), and did not increase muscle blood volume. In the third study, aerobic fitness is not related to muscle O_2 delivery and plasma ADMA concentrations in young male subjects with a wide range of aerobic fitness level. In the fourth study, increased plasma ADMA levels did not decrease muscle blood flow during low-treadmill running exercise in healthy rats. In conclusion, dietary NO_3^- supplementation could contribute to an improved tolerance to exercise by reducing O_2 cost during exercises at submaximal intensities. However, endurance-trained athletes with high $\dot{V}O_{2max}$ level do not benefit from the effects of dietary NO_3^- supplementation on exercise performance and muscle blood flow as reported in moderately trained subjects. Moreover, ADMA did not regulate muscle blood flow and O_2 delivery during exercise in conditions free from cardiovascular and metabolic diseases in humans and in the rat with pharmacological-induced increase in plasma ADMA levels.