HAL
open science

Effet des précurseurs de monoxyde d'azote sur la fonction vasculaire et la performance à l'exercice

Thibault Le Roux-Mallouf

To cite this version:

Thibault Le Roux-Mallouf. Effet des précurseurs de monoxyde d'azote sur la fonction vasculaire et la performance à l'exercice. Santé. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAS049 . tel-02893415

HAL Id: tel-02893415

https://theses.hal.science/tel-02893415

Submitted on 8 Jul 2020

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.

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Mouvement et Comportement pour la Santé et l'Autonomie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Thibault Le Roux-Mallouf

Thèse dirigée par **Samuel VERGES,**
Chargé de Recherche INSERM, Université Grenoble Alpes

Et co-dirigée par **Stéphane Doutreleau**
Maître de conférences des Universités
Praticiens Hospitaliers, Université Grenoble Alpes

Préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie Physiopathologie** (HP2), INSERM U1042, Grenoble, France

Dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Effet des précurseurs de monoxyde d'azote sur la fonction vasculaire et la performance à l'exercice

---

Thèse soutenue publiquement le **19 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Françoise Rannou Bekono,
PU Université de Rennes (rapporteur)

Vincent Pialoux,
PU Université de Lyon (rapporteur)

Stéphane Perrey,
PU Université de Montpellier (President du jury, examinateur)

Hervé Dubouchaud,
MCU Université Grenoble Alpes (examinateur)

Samuel VERGES,
CR INSERM Université Grenoble Alpes (directeur de thèse)

Stéphane Doutreleau,
MCU-PH Université Grenoble Alpes (co-directeur de thèse

Université Grenoble Alpes

Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé,

la Cognition et l'Environnement

Grenoble

Hôpital Sud

Unité Médicale Sports et Pathologies

Grenoble

INSERM
Unité 1042
Grenoble

Laboratoire Hypoxie Physiopathologie

Grenoble

Ecole Doctorale

ingénierie pour la santé, la cognition

et l'environnement

Grenoble

« Une thèse, c'est comme un triathlon longue distance… 3,8 km de bibliographie qui nous permettent de trouver des sensations et de regarder ce que font les autres, 188 km d'expérimentation et d'analyse de données où les douleurs apparaissent petit à petit, et enfin 42,195 km de tableaux Excel et de lignes écrites sur Word en se disant que l'on n'a pas fait tout le reste pour abandonner maintenant .... »

Thibault Le Roux-Mallouf (pas vraiment philosophe)

RÉSUMÉ

Depuis de nombreuses années, la prévention primaire et secondaire des atteintes cardiovasculaires chez l'homme est devenue un véritable enjeu de santé publique. L'axe principal de cette prévention est l'identification et le contrôle des facteurs de risques cardiovasculaires. Parmi eux, l'hypertension artérielle (30% des adultes en France) et la sédentarité (40% de la population française) sont des acteurs majeurs de la pathogénèse des maladies cardiovasculaires. La fonction endothéliale ainsi que la tolérance et la performance à l'exercice, sont utilisées comme de puissants marqueurs de morbi-mortalité cardiovasculaires.

Une fonction vasomotrice endothéliale normale permet de contrôler le tonus vasculaire, d'optimiser la circulation sanguine et participe au contrôle d'apports en oxygène et substrats énergétiques adaptés aux besoins tissulaires. Par la production de substances vasoactives, l'endothélium vasculaire assure en permanence un équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction. La fonction endothéliale est plastique, s'améliorant par exemple avec l'activité physique et s'altérant avec l'âge. La dysfonction endothéliale de son côté, se caractérise essentiellement par une moindre sécrétion de substances vasodilatatrices participant à l'élévation de la pression artérielle, une augmentation de la rigidité artérielle et à une altération des échanges sang-tissus.

L'une des substances vasodilatatrices majeures est le monoxyde d'azote (NO), synthétisé au niveau de l'endothélium, par la NO-synthase endothéliale (eNOS), et dont la diffusion vers les cellules musculaires lisses sous-jacentes, entraine leurs relâchements. Cette synthèse endogène majeure est complétée par une synthèse de NO issue d'une simple réduction de l'ion nitrite en NO au niveau vasculaire. Les mécanismes proposés pour expliquer la baisse de la synthèse endothéliale de NO incluent une diminution de l'activité

enzymatique (eNOS) et/ou une insuffisance en substrats et cofacteurs disponibles pour celle-ci. Cette diminution de la biodisponibilité en NO peut être compensée, soit par optimisation de l'activité de la NOS, soit par un apport de NO au niveau vasculaire. Bien que la littérature ait largement étudié l'effet de précurseur de NO sur la santé et la performance à l'exercice, les résultats restent très contrastés, notamment du fait de questions méthodologiques, et l'intérêt réel de ce type d'intervention nécessite d'être clarifié.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet de différentes interventions nutritionnelles capables d'augmenter la biodisponibilité en NO au niveau vasculaire, chez le sujet sain. Nous avons évalué l'effet de l'augmentation de la biodisponibilité en NO en supplémentant les voies NOS-dépendantes (L-arginine, L-citrulline) et/ou NOS-indépendantes (nitrate) de façon aigüe ou chronique, avec ou sans programme d'entraînement à l'effort simultané, chez des sujets sains jeunes ou âgés, sur la fonction vasculaire et les performances à l'effort.

Chez le sujet jeune en bonne santé, il apparait que l'ingestion de précurseurs de NO améliore la fonction endothéliale évaluée par la vasodilatation post-ischémique, sans impacter ni la pression et la rigidité artérielle, ni la performance à l'exercice. En revanche, la supplémentation en nitrate et citrulline optimise les effets de l'entrainement sur la force maximale et l'endurance de force. Chez le sujet âgé, la prise chronique de nitrate et citrulline réduit la pression artérielle et améliore la puissance maximal aérobie en diminuant la VO_2 et la fréquence cardiaque sous maximale.

Mots-clés: Monoxyde d'azote; nitrate; L-citrulline, L-arginine, fonction endothéliale, exercice.

ABSTRACT

Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases is a major public health concern. Cardiovascular prevention is mainly underpinned by the control of cardiovascular risks. Among them, arterial hypertension (30% of adults in France) and sedentarity (40% of french population) represents two main targets in cardiovascular prevention. Endothelial function as well as exercise tolerance and performance (fitness status) are used as powerful markers of cardiovascular morbidity-mortality.

A normal vasomotor endothelial function allows to regulate vascular tone. By synthesising vasoactive substances, vascular endothelium continuously maintains an optimal balance between vasodilation and vasoconstriction to match oxygen and energetic substrate supply to the demand. Endothelial function is plastic, and is increased for instance by physical activity and decreased with age. Endothelial dysfunction is essentially characterized by the production of less vasodilation substances, inducing an increase in blood pressure, arterial stiffness and leading to blood-tissue exchanges alterations. Degrees of endothelial dysfunction is considered as a cardiovascular risk marker.

One major vasoactive substance is nitric oxide (NO), which is produced by NO-synthase (NOS) in endothelium, and is a mediator of smooth muscle cells relaxation. This major endogen synthesis can be complemented by NO synthesis from simple reduction of nitrite to NO. Several mechanisms are provided to explain a decrease in NO endothelial synthesis, including decrease of enzymatic activity (NOS) and/or an inadequate substrate or cofactor bioavailability. This decrease in NO bioavailability can be offset, either by NOS activity optimization, or increase NO bioavailability at a vascular level. Although the effects of NO precursor supplementation on health and exercise performance have been

extensively studied, results are somehow controversial, mainly due to methodological discrepancies. Thus, the real interest of these types of interventions stays unclear.

Thought this thesis work, we were interested to physiological effect in healthy subjects of different interventions which may increase NO bioavailability at vascular level. Focusing on food supplement consumption, we differentiated two NO precursor, two supplementation modalities, and two populations.

We have assessed effect of increasing NO bioavailability by acute or chronic supplementation of both NOS-dependent (L-arginine, L-citrulline) and/or NOS-independent (nitrate) pathways, with or without simultaneous training program, in young and older healthy subjects, on vascular function and exercise performances.

In healthy young individuals, NO precursor intake increase endothelial function assessed by post-ischemic vasodilation, without effect neither on arterial pressure and fitness nor on exercise performances. However, nitrate and citrulline supplementation increase exercise training effect on maximal strength and strength endurance. In healthy older adults, chronic intake of nitrate and citrulline reduce arterial pressure and improve maximal aerobic power by decrease of submaximal VO_2 and heart rate.

Keys-words: Nitric oxyde; nitrate; L-citrulline, L-arginine, endothelial function, exercise.

Remerciements

« Imaginer un monde meilleur, c'est affirmer que rien n'est plus important que de manifester sa considération pour l'autre. »
Axel Kahn

Durant ces trois années de thèse, j'ai compris que la considération inconditionnelle de l'autre était le fondement des relations humaines. Le travail de recherche m'a beaucoup apporté, mais au-delà de ça, j'ai pu partager mes heures et mes journées avec des personnes extraordinaires. Pour leur aide, leurs conseils, leur accompagnement, leurs réponses, leur soutien, leur réconfort, ou juste leur sourire et leur gentillesse, je remercie ici toutes ces personnes qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout…

A Samuel Verges, pour son accueil dès ma première année de Master, pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordé tout au long des années qui ont suivi, pour ses conseils et retours exigeants et très formateurs,

A Stéphane Doutreleau, (pour le chocolat), pour son expertise scientifique sur la thématique de recherche, son aide et son accompagnement permanent sur le plan humain et professionnel,

A *Stéphane et Mathieu Viscuso*, gérant de la société Netquattro (co-financeur de la collaboration CIFRE) qui m'ont accordé leur confiance sur ce projet de développement,

A Françoise Rannou Bekono et Vincent Pialoux qui ont accepté d'évaluer ce travail,

A *Stéphane Perrey* et *Hervé Dubouchaud,* qui ont accepté de faire partie de ce jury,

A ma famille de doctorant, Léa, Samarmar, Julie, Anna, Mathieu, et *Marion*, avec qui j'ai entretenu une relation hors du commun qui ne se vit qu'une fois dans une vie. La sensation que ce sont les seules personnes qui puissent réellement te comprendre sans que tu aies à leur expliquer. S'aider sans compter, se donner du temps alors que l'on en a pas, s'accompagner, se réconforter, s'écouter, s'acheter du chocolat, se soutenir même si on a tort. Je ne les remercierai jamais assez, mais je peux au moins leur dire que je ne les oublierai pas….

A Sébastien Bailleul, pour son aide et ses conseils pertinents, mais aussi et surtout pour son soutien et sa gentillesse tout simplement unique. Un modèle de courage et d'humanité qui restera longtemps dans mes pensées,

A Julien Laurent, pour son aide précieuse pendant son post-doc au sein du laboratoire, ses conseils et son partage d'expériences, et à tous ces moments vécus ensemble qui redonnent le sourire,

A Bernard, Patrice, Michel, Monique et Véronique qui ont été à l'écoute et toujours prêts à m'aider sans compter. Merci pour l'accompagnement scientifique, professionnel et moral au quotidien, aussi important qu'enrichissant,

Aux techniciennes et infirmières du laboratoire (et Julien ☺), que j'ai embêtées sans relâche pendant 5 ans. Merci pour leur patience, leur gentillesse et leur collaboration bien plus que nécessaire au bon déroulement de toutes mes heures d'expérimentation (Merci au rire de Maud dans le couloir à longueur de journée ☺),

A mes stagiaires, Florence, Aurélie, Raquel, Dimitri, Félix, Angela, et Idir qui ont tous énormément contribué à ce travail de thèse,

A Elise Belaïdi, qui a patiemment pris le temps de me faire découvrir les techniques d'analyse des nitrates et nitrite sanguins,

A *Hervé Dubouchaud* qui est un de ces enseignants qui vous transmettent leur passion, et vous font comprendre simplement que vous aimez la physiologie. Merci également à la confiance qu'il m'a apporté dans l'enseignement au sein de l'UFRAPS,

A Guillaume PY pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et fait découvrir la recherche en physiologie de l'exercice pendant mes années de licence à l'UFRSTAPS de Montpellier,

A l'ensemble des 80 personnes qui ont donné de leur temps et participé aux différentes expérimentations,

A Camille Noury (Chef produit chez Netquattro), pour son aide plus que précieuse dans le développement du complément alimentaire et l'importance qu'elle aura porté à la finalisation de ce travail de thèse,

A Sophie Creton (Chef de service chez Netquattro), pour son accueil au sein de l'entreprise, le partage de son expérience et sa confiance sur l'ensemble des missions que j'ai pu réaliser avec elle,

A Laurianne Baranger, Anthony Jacquet, Marion Chaussis(sonsec), Kiki et Amanda Oriot pour leur accueil plus que chaleureux au sein de l'entreprise, les innombrables sourires et fous rires (la tonne de chocolat), tout simplement des personnes ressources, avec qui je souhaite à tout le monde de pouvoir travailler un jour,

A l'ensemble des collaborateurs de chez Netquattro pour l'aide qu'ils m'ont apportée,

A Clément Ginoux pour sa présence et son amitié inconditionnelle, sa gentillesse et son soutien depuis notre premier jour de Master 1 en filière recherche, et pour tous ces moments de partages, ces soirées, et ses encouragements qui donnent la force d'aller au bout,

A Valentin Genuer pour la joie qu'il m'a apportée, ces souffrances partagées sur les kilomètres de chemins et dans les eaux froides des lacs de montagnes, pour m'avoir permis de vivre ces moments inoubliables qui marquent une vie,

A mes amis d'enfance, Marco, Corki, Phasme, la Gigue, le blond, PV, Torch, Vinc, Clovis, Pops pour leur soutien tout en finesse et ces moments qui font tant de bien quand je les retrouve,

A Eric Brunet pour l'intérêt qu'il aura porté sur ce travail, et son aide plus que précieuse,
A *Sophie Brunet* pour son aide, ses innombrables messages d'encouragements, ses attentions et tous ces chocolats et gâteaux (extraordinaire !!) qui m'ont donné l'enérgie qu'il me fallait,

Enfin à toute ma petite famille, qui m'a offert une enfance pleine d'amour et d'affection, et à ma grand-mère qui me regarde d'en haut et qui me donne la force qu'il faut quand les moments sont difficiles,

A mes parents, que je ne saurais comment remercier… A tous ces moments magiques avec eux qui sont toujours trop courts, à leur amour, leur protection, leur tendresse, et l'équilibre qu'ils m'ont apporté depuis toutes ces années. Jour après jour je n'oublie pas

tout ce qu'ils ont fait et font encore pour moi, toutes ces choses qui me permettent de vivre tout ça aujourd'hui.
A mon papa, que je remercie pour tout ce qu'il m'apporté et appris, pour son humanité sa patience et son écoute, un amour discret mais tellement immense.
A ma maman, unique au monde, un modèle d'amour, de générosité, de partage et de considération de l'autre, une maman présente 35h sur 24…

A mon grand-frère, qui m'a piqué ma chambre, mes tartines de Kiri, mes chaussettes de sport, et qui ma martyrisé (gentiment) pendant toute mon adolescence, mais qui m'a quand même rejoint à Grenoble… Il fait partie de ma vie, comme une évidence, il m'a toujours guidé, aidé, encouragé, protégé, et aimé sans compter. Un grand frère pas comme les autres, à qui je dois beaucoup, et que je ne remercie sûrement jamais assez…

Enfin à ma Manon, ma moitié, qui me supporte depuis 7 ans … Pour sa gentillesse, sa patience, son positivisme et son soutien inconditionnel dans tous mes choix. Pour son sourire ressourçant, ses attentions, sa tendresse, son énergie, et tout simplement pour l'amour qu'elle m'apporte au quotidien. Un équilibre permanent qui m'a permis d'aller jusqu'au bout.

Merci également à tous ceux qui m'auront apporté de la joie et de la bonne humeur au quotidien.

« Un sourire ne coûte rien et produit beaucoup
Il enrichit ceux qui le reçoivent
Sans appauvrir ceux qui le donnent
Il ne dure qu'un instant
Mais son souvenir est parfois éternel
Personne n'est assez riche pour s'en passer
Personne n'est assez pauvre pour ne pas le mériter
Il crée le bonheur au foyer
Il est le signe sensible de l'amitié
Un sourire donne du repos à l'être fatigué
Rend du courage aux plus découragés
Il ne peut n'y s'acheter, ni se prêter, ni se voler
Car c'est une chose qui n'a de valeur
Qu'à partir du moment où il se donne
Et si quelquefois vous rencontrez une personne
Qui ne sait plus avoir le sourire
Soyez généreux, donnez-lui le vôtre
Car nul n'a autant besoin d'un sourire
Que celui qui ne peut en donner aux autres. »

Raoul Follereau, "Le Livre d'amour" (1920)

Tables des matières

FITNESS BOUTIQUE® 23

Mes expériences 25

INTRODUCTION GENERALE 29

REVUE DE LITTERATURE 33

Le monoxyde d'azote (NO) 34

Les effets physiologiques du monoxyde d'azote 35

Les voies de synthèse du monoxyde d'azote 38

Monoxyde d'azote et fonction cérébrale 44

Monoxyde d'azote et performance à l'exercice 47

La biodisponibilité en NO 51

Augmentation par la voie NOS-dépendante 51

Augmentation par la voie NOS-indépendante 59

Les effets des précurseurs de NO 67

Les différents types de populations 67

Influence du niveau d'oxygènation systémique 72

Influence des différents types d'exercices 74

CONTRIBUTION PERSONNELLE 83

Objectifs scientifiques 84

Méthodologie générale 87

Compléments alimentaires 87

Evaluation de la réponse hyperémique post-occlusive 88

Evaluation de la fonction neuromusculaire 89

Exploration fonctionnelle à l'exercice 98
Réponse à l'hypercapnie et l'hypoxie.....100
Spectroscopie proche infrarouge.....101
Mesure de la rigidité artérielle 103
Questionnaires.....104
Résultats.....105
Publication n°1 : Supplémentation aigüe et fonction vasculaire 107
Publication n°2 : Supplémentation aigüe et performance 129
Publication n°3 : Supplémentation chronique chez la personne âgée..163
Publication n°4 : Supplémentation chronique et entrainement.....195
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES 227
Quel intérêt sur la fonction vasculaire ? 229
Quel intêret sur la fonction vasculaire à l'effort ?.....232
Y a-t-il un intérêt ergogénique ?.....233
Conclusion 237
Pour aller plus loin.....237
Développement du complément alimentaire **Erreur ! Signet non défini.**
BIBLIOGRAPHIE..... 245
ANNEXE..... 277

Publications

Issues des travaux de thèse

Le Roux-Mallouf, T., Vibert, F., Doutreleau, S., and Verges, S. 2017. Effect of acute nitrate and L-citrulline supplementation on muscle microvascular response to ischemia-reperfusion in healthy humans. Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.: 1–8. doi: 10.1139/apnm-2017-0081.

Le Roux-Mallouf, T, Julien Laurent, Dimitri Besset, Mathieu Marillier, Julie Larribaut Elise Belaidi, Stéphane Doutreleau, Samuel Verges. Effects of acute NO precursor intake on peripheral and central fatigue during knee extensions in healthy men. Soumis.

Le Roux-Mallouf, T, Pelen Felix, Vallejo Angela, Stéphane Doutreleau, Samuel Verges. Effects of acute NO precursor intake on vascular function and exercise performance in older adults. Soumis.

Le Roux-Mallouf, T [1,2], Pelen Felix [1,2], Vallejo Angela [1,2], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]. Effect of chronic nitrate and citrulline supplementation and exercise training in healthy active young individuals. Soumis.

Issues de travaux en parallèle de la thèse

Marillier, M., Arnal, P.J., **Le Roux Mallouf, T.,** Rupp, T., Millet, G.Y., and Verges, S. 2017. Effects of high-altitude exposure on supraspinal fatigue and corticospinal excitability and inhibition. Eur. J. Appl. Physiol. doi:101007/s00421-017-3669-y.

Rupp, T., **Le Roux-Mallouf, T.**, Perrey, S., Wuyam, B., Millet, G.Y., and Verges, S. 2015. CO2 Clamping, Peripheral and Central Fatigue during Hypoxic Knee Extensions in Men. Med. Sci. Sports Exerc. 47(12): 2513–2524. doi:10.1249/MSS.0000000000000724.

Laurent J, Guinot M, **Le Roux-Mallouf, T.**, Marillier, Larribaut J, Verges S. 2018. Effects of Acute Salbutamol Intake on Peripheral and Central Fatigue in Trained Men. Med Sci Sports Exerc. 2018 Jun;50(6):1267-1276. doi: 10.1249/MSS.0000000000001565.

Marillier M, Gruet M, Baillieul S, **Le Roux-Mallouf, T.**, Wuyam B, Tamisier R, Levy P, Pepin JL, Verges S. 2018. Neuromuscular Dysfunction and Cortical Impairment in Sleep Apnea Syndrome. Med Sci Sports Exerc. 2018 Aug;50(8):1529-1539. doi: 10.1249/MSS.0000000000001625.

Communications orales et affichées

Le Roux-Mallouf, T., Vibert, F., Doutreleau, S., and Verges, S., (poster, 2016). Effect of acute NO pathway supplementation on flow mediated dilation of the lower limb assessed by near infrared spectroscopy. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, 2017, 27 S1-S20, Human kinetics, International sports and exercise nutrition conference (ISENC), Newcastle.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. ANATOMIE D'UN VAISSEAU SANGUIN (ZHAO, VANHOUTTE, AND LEUNG 2015) 35
FIGURE 2. EFFET DU NO DANS LE COMPARTIMENT VASCULAIRE (ATOCHIN AND HUANG 2010) 36
FIGURE 3. LES DEUX VOIES DE PRODUCTION DE NO (BESCOS ET AL. 2012) 39
FIGURE 4 ACTIVATION DE LA NOS 40
FIGURE 5. VOIE DE PRODUCTION DE MONOXYDE D'AZOTE NOS-INDEPENDANTE AU SEIN DE LA LUMIERE VASCULAIRE 42
FIGURE 6. L'EQUILIBRE DE LA SYNTHESE DE MONOXYDE D'AZOTE AU SEIN DE L'ORGANISME. 44
FIGURE 7. L'UNITE NEUROVASCULAIRE (ADAPTE DE COLIN GERBER, 2011)) 46
FIGURE 8. LA L-ARGININE : UN SUBSTRAT ENZYMATIQUE (ADAPTE DE WU AND MORRIS, 1998) 52
FIGURE 9. SYNTHESE ENDOGENE DE L-ARGININE (ADAPTE DE WU AND MORRIS, 1998) 53
FIGURE 10. METABOLISME DE LA L-CITRULLINE 57
FIGURE 11. REACTION D'OXYDO-REDUCTION DU NO 60
FIGURE 12. VOIE NOS-INDEPENDANTE (A. M. JONES ET AL. 2018) 61
FIGURE 13. LES MECANISMES DE L'AUGMENTATION DE LA PERFORMANCE PAR LE NO (ADAPTE DE JONES ET AL. 2018) 75
FIGURE 14. META-ANALYSE SUR LES EFFETS ERGOGENIQUES DU NO DURANT UN EFFORT DE CONTRE-LA-MONTRE (ADAPTE DE JONES ET AL. 2018). 77
FIGURE 15. EFFET DES PRECURSEURS DE NO SUR LA PERFORMANCE EN ENDURANCE LORS D'EXERCICES A INTENSITE CONSTANTE OU PROGRESSIVE (MCMAHON, LEVERITT, AND PAVEY 2017) 78
FIGURE 16. SCHEMA DES PARAMETRES DE L'ANALYSE DE LA REPONSE POST-OCCLUSIVE LORS DU TEST D'ISCHEMIE REPERFUSION 89
FIGURE 17. SITES ET CAUSES POTENTIELS DE LA FATIGUE NEUROMUSCULAIRE (D'APRES EDWARDS (1981)). 90
FIGURE 18. CALCUL DU NIVEAU D'ACTIVATION VOLONTAIRE (NAV) PAR LA TECHNIQUE DE LA SECOUSSE SURIMPOSEE ("TWITCH INTERPOLATED TECHNIQUE", MERTON (1954)) 92
FIGURE 19. DETERMINATION DU NIVEAU D'ACTIVATION VOLONTAIRE PAR STIMULATION MAGNETIQUE TRANSCRANIENNE. 94
FIGURE 20. DETERMINATION DU SITE OPTIMAL DE STIMULATION POUR LE QUADRICEPS DROIT 96
FIGURE 21. TEST DE REPONSE A L'HYPERCAPNIE 101
FIGURE 22. MESURE DE LA REPONSE HEMODYNAMIQUE ET DE L'OXYGENATION CEREBRALE PAR SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE AU NIVEAU DU CORTEX PREFRONTAL GAUCHE 102
FIGURE 23. PLACEMENT DES OPTODES DE NIRS SUR LE VASTE LATERAL 102

TABLEAU 1. EFFET DE LA SUPPLEMENTATION EN PRECURSEUR DE MONOXYDE D'AZOTE SUR LA PERFOMANCE EN CONDITION HYPOXIQUE. 74
TABLEAU 2. LES DIFFERENTS PARAMETRES DE LA MESURE DE FATIGUE NEUROMUSCULAIRE. 95

Abréviations

NO	Monoyde d'azote
NOS	NO-synthase
eNOS	NO-synthase endothéliale
nNOS	NO-synthase neuronale
CMV	contraction maximale volontaire
DSC	débit sanguin cérébral
EMG	Electromyographie
ERT	*extrapolated resting twitch*
FC	fréquence cardiaque
FiO_2	fraction inspirée en oxygène
FMV	force maximale volontaire
HbO_2	oxyhémoglobine
HbTot	hémoglobine totale
HHb	Déoxyhémoglobine
MEP	potentiel évoqué moteur - *motor evoked potential*
NAV	niveau d'activation volontaire
NAV_{TMS}	niveau d'activation volontaire (stimulation magnétique transcrânienne)
NIRS	spectroscopie proche infrarouge - *near infrared spectroscopy*
$P_{ET,CO2}$	pression de fin d'expiration en dioxyde de carbone
PiO_2	pression inspirée en oxygène
RCV	réactivité cérébrovasculaire
RMS	amplitude du signal électromyographique - *root mean square*
RMT	seuil moteur de repos - *resting motor threshold*
SaO_2	saturation artérielle en oxygène
SP	période de silence - *silent period*
SpO_2	saturation pulsée en oxygène
FMD	Flow-mediated dilation : réponse hyperémique flux dépendante
TMS	stimulation magnétique transcrânienne
Tw	réponse mécanique évoquée par stimulation électrique d'un nerf (*twitch)*
L-NMMA	N-monométhyl-L-arginine
ADMA	diméthylL-arginine asymétrique
$\dot{V}O_{2max}$	consommation maximale en oxygène
$\dot{V}O_{2pic}$	réponse mécanique évoquée par stimulation électrique d'un nerf ou d'un muscle - *twitch*
VOPcf	Vitesse de l'onde de pouls carotido-femoral
VOPcd	Vitesse de l'onde de pouls carotido-distal
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
PKG	Protéine kinase G
BH4	tétrahydrobioptérine
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ATP	Adénosine triphosphate
PA (S,D,M)	Pression artérielle (systolique, diastolique, moyenne)

FITNESS BOUTIQUE®

Ce travail de thèse fait l'objet d'une collaboration CIFRE co-financée par la société FitnessBoutique® appartenant au groupe Netquattro.

FitnessBoutique® est née en 1999 par la création d'un site de vente en ligne d'appareils de fitness haut de gamme. Rapidement déployée à l'international, FitnessBoutique® franchit un cap déterminant en 2004 avec la création d'un réseau de points de vente physiques et l'élargissement de l'offre vers la nutrition sportive. Ce concept multicanal, précurseur du « Web to Store », devient la force du réseau et pose les bases d'une progression incessante, accélérée notamment par l'ouverture à la franchise en 2011. Depuis quelque années, cette progression incessante est catalysée par l'essor du marché du fitness en France et à l'international, marqué par une popularisation de la pratique d'activité physique dans un objectif de bien-être, de santé ou d'esthétique. Durant ces années, FitnessBoutique® parvient à s'adapter, innover et développer, notamment dans la nutrition sportive, gardant toujours une longueur d'avance et une compétitivité sérieuse sur son marché. Aujourd'hui, FitnessBoutique® dont le siège social se trouve sur la commune de Voiron, à 20 km de Grenoble, compte plus de 90 points de vente en France, en Europe mais aussi au Sénégal et au Maroc.
Dans une démarche d'innovation et de développement, c'est naturellement que Stéphane Viscuso, le président de FitnessBoutique®, s'est dirigé vers la recherche scientifique par l'intermédiaire d'une collaboration CIFRE. L'objectif était de développer une offre de compléments alimentaires qualitative en apportant l'expertise et les preuves scientifiques universitaires.

Dans le monde de la musculation, l'une des catégories de produits appelée « PRE-WORKOUT » a pour but d'augmenter la congestion musculaire pendant l'activité physique. Celle-ci englobe des formulations assez redondantes, composées d'ingrédients considérés comme stimulants (caféine, taurine…) et d'autre comme vasodilatateurs. L'effet stimulant de certains ingrédients est relativement bien décrit et populairement admis. La caféine par exemple fait l'objet d'allégations nutritionnelles permettant de mettre en avant son effet sur la performance à l'effort ou sur la vigilance. L'effet physiologique sur la vasodilatation s'avère en revanche moins évident.

Ainsi, l'objectif industriel de ce travail de thèse était de développer un complément alimentaire, répondant aux exigences du marché actuel, et permettant d'optimiser la vasodilatation pendant l'exercice physique, et notamment l'exercice de musculation. L'objectif scientifique était d'identifier les ingrédients actifs les plus à même d'améliorer la vasodilatation chez la personne en bonne santé, et d'évaluer cliniquement leurs effets physiologiques chez l'homme.

Mes expériences

La collaboration CIFRE m'a permis de vivre une thèse riche en expériences, que ce soit dans le monde de l'entreprise à raison d'un ou deux jour par semaine sur le site de FitnessBoutique® à Voiron, sur un aspect scientifique au sein du laboratoire, et au sein de la communauté universitaire par l'enseignement. En dehors du travail scientifique synthétisé dans ce manuscrit, ces trois années de travail m'ont beaucoup apporté. Le paragraphe ci-dessous décrit de manière non-exhaustive la liste des missions principales sur lesquelles j'ai travaillé durant ces trois dernières années.

FitnessBoutique®

Membre de l'équipe développement produit :

- Développement de formulations en fonction de la demande, des gammes cibles et des objectifs physiologiques de chaque complément alimentaire,
- Mise en place des plans de gamme (viabilité des projets, estimation des coûts de revient et de la marge plateforme et magasin, etc…),
- Bibliographie scientifique sur les effets physiologiques des ingrédients actifs,
- Recherche de fournisseurs et sourcing de matières premières,
- Intermédiaire scientifique auprès des fournisseurs,
- Développement de connaissances réglementaires sur le développement de denrées ou compléments alimentaires (formulations, doses, effet synergiques, étiquetages, allégations…),
- Echanges avec la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGGCCRF), et la Direction départementale de la protection des populations (DDPP) sur le placement règlementaire des références distribuées,
- Gestion du dossier de la certification Agriculture biologique (AB) pour la distribution assurée par FitnessBoutique®.

Développement du complément alimentaire du projet de recherche :

- Recherche du fournisseur de matière première végétale enrichie en nitrate. Au total, 19 professionnels de l'extraction végétale ont été contactés avant de trouver le collaborateur actuel,
- Développement du cahier des charges du complément alimentaire : formulation, galénique, dose des ingrédients, conditionnement (packaging), placement règlementaire,
- Déplacements et visites auprès des fournisseurs potentiels,
- Essais de formulation et d'aromatisation chez les façonniers impliqués dans le projet.

Divers :

- Formateur à l'Ecole du Fitness et de Nutrition Sportive (EFNS). Formation auprès des vendeurs et managers de magasin sur les bases de la nutrition du sportif, et l'intérêt des compléments alimentaires,
- Mise en place du plan de contrôle qualité des denrées et compléments alimentaires mis sur le marché. Envoi des échantillons au laboratoire, demande des analyses, vérification des résultats, mise en place du procédé de suivi,
- Constitutions des dossiers règlementaires pour l'ouverture magasin sur le continent Africain.

Enseignement universitaire à l'université Grenoble Alpes

UFR STAPS de Grenoble et Valence :

- Tutorat étudiant haut niveau, Licence : 15 h
- UE endocrinologie, Licence 2ème année (CM, TD et TP) : 116.5 h
- UE physiologie en condition d'altitude, Licence 3ème année (TD) : 12h
- UE adaptation à l'entrainement, de Licence 3ème année (TP) : 24h
- UE fatigue et mouvement, Master 1er année (CM) : 24h + (CCF/CT)
- Tutorat de projet, Master 1er année (accompagnement) : 3h

<u>Total</u> **:** 194.5 heures

Laboratoire HP2

Analyse des prélèvements sanguins

Durant la deuxième phase d'expérimentation j'ai effectué au sein du laboratoire, l'analyse des prélèvements sanguins des 15 participants inclus dans 4 conditions expérimentales. J'ai pu ainsi, en collaboration avec l'équipe de recherche fondamentale, effectuer le dosage des nitrites et nitrates sanguin en utilisant le réactif de Griess.

Ecole d'automne d'oxymétrie cérébrale

Mon statut de doctorant m'a permis de suivre une formation à l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge dans l'exploration de l'oxygénation cérébrale à l'école de médecine d'Amiens. Cette technique de mesure non-invasive a été utilisée sur chacun des protocoles de mon travail de thèse, et il était important que j'en comprenne son fondement, ses avantages et ses limites. J'ai pu ensuite partager et confirmer ces connaissances lors de deux rassemblements avec la 2f-NIRS (french community for functional NIRS).

Encadrement de stagiaires :

- Aurélie Diomandée (Master 1), Florence Vibert (Master 1, externat faculté de médecine), et Rachel Escrich (licence 3) m'ont accompagné dans la mise en place et la réalisation des expérimentations ainsi que l'analyse des données du premier protocole **(*publication 1*)**. Ce travail a fait l'objet de leur mémoire de fin d'étude respectif.
- Dimitri Besset (Master 2 faculté de biologie) a participé à l'analyse des données du deuxième protocole ***(publication 2)***, et les a présentées dans son mémoire de Master 2 spécialité recherche. Il a également participé aux réflexions sur la mise en place des expérimentations pour les protocoles 3 et 4 ***(publication 3 et 4)***.
- Félix Pelen (internat de médecine), accompagné de Angela Vallejo (Master 2 STAPS), a participé au troisième protocole ***(publication 3)***, réalisé une très grande partie des expérimentations et a été très actif dans l'analyse de données. Il a pu présenter son mémoire de fin d'études sous forme d'article scientifique ***(publication 3)***.
- Angela Vallejo (Master 2), accompagnée de Félix Pelen, a participé au quatrième protocole ***(publication 4)***, réalisé une très grande partie des expérimentations et

des séances d'entrainement, et a été très active dans l'analyse de données. Elle a pu présenter son mémoire de fin d'études sous forme d'article scientifique ***(publication 4)***.

- Idir Halimaoui (Master 1 STAPS) a pu travailler en collaboration avec Félix et Angela afin de se familiariser avec l'acquisition et l'analyse de données, autant sur le troisième que le quatrième protocole. En lien avec la thématique Entrainement Sportif de son Master, il a pu axer son travail de mémoire sur le troisième protocole ***(publication 3)***.

Protocoles de recherche effectués en parallèle de la thèse :

- **Neurox :** Ce protocole visait à évaluer les effets d'un traitement par pression positive continue chez le patient apnéique sur les performances à l'effort. J'ai effectué les expérimentations en collaboration avec Mathieu Marillier, et ainsi comprendre le concept de fatigue neuromusculaire, et maitriser les techniques de stimulation magnétique transcranienne et stimulation électrique périphérique, que j'ai utilisées dans la ***publication 2***,
- **CIHGAIT :** Ce protocole visait à évaluer chez le patient apnéique l'effet du traitement par pression positive continue sur la marche et la posture, avec ou sans tâche cognitive effectuée simultanément. En accompagnant Sébastien Bailleul, médecin au sein du laboratoire et spécialiste des altérations cérébrales chez le patient apnéique, ces expérimentations m'ont permis de me familiariser avec l'utilisation des tâches cognitives et d'intégrer le concept de commande centrale et contrôle moteur,
- **BETACTIV :** Julien Laurent, postdoc au sein du laboratoire a travaillé sur l'effet du salbutamol sur les performances à l'exercice et la fatigue neuromusculaire. Nous avons pu travailler ensemble pour imaginer et réaliser les expérimentations utilisées dans son projet ainsi que celles présentées dans la ***publication 2*** permettant l'analyse de la fatigue neuromusculaire,
- **Protocole UT4M** : Ce protocole de recherche a été effectué en Juillet-Août 2018 sur l'Ultra trail des 4 Massifs. Nous avons évalué la fatigue (fatigue neuromusculaire, fatigue cardiaque, données physiologiques, …) sur les différents formats de course avant et directement après, puis 2, 5 et 10 jours après. Ceci m'a permis de découvrir les exigences et les contraintes de la recherche appliquée sur le terrain.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de décès dans le monde (Murray et al., 2012). La survenue de ces complications cardiovasculaires a été décrite comme dépendante de différents facteurs de risques : l'âge, l'hérédité, le tabagisme, l'obésité, les dyslipidémies, l'hypertension artérielle, l'inflammation à bas bruit, la sédentarité, la malnutrition et la pollution. L'addition de ces facteurs, comme dans le cas d'un syndrome métabolique, a des répercussions cardiovasculaires importantes, notamment au niveau de la fonction endothéliale (J. Kim et al. 2006; Steinberg and Baron 2002). La dysfonction endothéliale qui en découle semble jouer un rôle physiopathologique de premier plan, altérant les paramètres circulatoires, déclenchant ainsi l'initiation de complications cardiovasculaires telle que l'athérosclérose (Napoli et al., 2006).

L'endothélium vasculaire, qui tapisse l'intérieur de tout le système cardio-vasculaire, joue plusieurs rôles physiologiques majeurs, dont le plus important est le contrôle du tonus vasculaire. Dans des conditions physiologiques, l'endothélium sécrète des substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO) ou vasoconstrictrice comme l'endothéline, et contrôle le diamètre artérielle (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro, 1990) et le débit sanguin local. L'augmentation des forces de cisaillement endothéliales en réponse à l'augmentation du débit sanguin se traduit ainsi par une vasodilatation (dite flux-dépendante). Ces adaptations permettent de limiter l'aspect turbulent de la circulation sanguine et de répondre aux besoins tissulaires, notamment en oxygène et substrats énergétiques, par exemple pour le muscle à l'exercice.

Le NO, par son action vasodilatatrice, mais aussi par son rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Moncada et al., 1991), joue un rôle clef pour la qualité de la fonction endothéliale, y compris au niveau cérébral. La baisse de la biodisponibilité en NO est la caractéristique principale de la dysfonction endothéliale vasculaire (Maxwell 2002; Tousoulis et al., 2012). Au sein de l'endothélium, le NO est issu d'une réaction oxygène dépendante catalysée par l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS) à partir d'un acide aminé, la L-arginine. La synthèse du NO peut être altérée soit par déficit en substrats et/ou en cofacteurs, soit par l'altération de son fonctionnement enzymatique. Ainsi, la modification de la biodisponibilité en NO par augmentation de l'activité enzymatique ou par apport exogène, semble constituer une solution pour, soit améliorer la dysfonction endothéliale dans un but thérapeutique, soit optimiser la fonction endothéliale dans un but ergogénique.

La modification par la nutrition de la biodisponibilité en NO chez le sujet sain, le patient, ou le sportif entrainé a fait l'objet de nombreuses études depuis plus de vingt ans (Allerton et al. 2018; A. M. Jones et al. 2018). La biodisponibilité en NO est augmentée classiquement de deux manières :

- ☺ Soit par augmentation de L-arginine plasmatique après apport en L-arginine ou L-citrulline (voie NOS-dépendante),
- ☺ Soit par la voie dite NOS-indépendante, qui permet d'augmenter la biodisponibilité en NO par réduction successive du nitrate (issue de l'alimentation) en nitrite, et du nitrite en NO.

Ces deux solutions nutritionnelles ont été étudiées sous forme de prise aigüe ou prise chronique, par l'utilisation de compléments alimentaires ou par une alimentation riche en aliments apportant ces précurseurs. Bien que la littérature ait très largement étudié l'effet de précurseurs de NO sur la santé et la performance à l'exercice, les résultats restent très contrastés, notamment par des questions méthodologiques (type de supplémentation, caractéristiques des populations étudiées…) et l'intérêt réel de ce type d'intervention reste à clarifier.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à différentes approches disponibles pour augmenter la biodisponibilité en NO au niveau vasculaire et aux effets physiologiques qui en découlent. En se focalisant sur l'ingestion de compléments alimentaires, nous avons différencié :

- ☺ deux types de précurseurs de NO,
- ☺ deux modalités de supplémentation (aigüe et chronique),
- ☺ deux populations (sujets jeunes ou âgés).

Nous avons évalué l'effet de l'augmentation de la biodisponibilité en NO en supplémentant les voies NOS-dépendantes (L-arginine, L-citrulline) et/ou NOS-indépendantes (nitrate) de façon aigüe ou chronique (avec ou sans programme d'entraînement à l'effort simultané) sur la fonction vasculaire et les performances à l'effort. Ces travaux ont visé à caractériser les effets de la prise d'un précurseur de NO sur la santé cardiovasculaire et la performance à l'exercice afin d'en évaluer les potentiels intérêts thérapeutiques et ergogéniques.

Ce manuscrit de thèse se compose de trois parties. Dans un premier temps, nous ferons l'état des connaissances actuelles sur les rôles physiologiques du monoxyde d'azote, et son implication dans la fonction vasculaire et la performance à l'effort. Nous considèrerons les effets physiologiques des différentes interventions capables d'augmenter la biodisponibilité systémique en NO.

Dans un second temps, nous décrirons notre contribution personnelle aux thématiques abordées en décrivant les méthodes utilisées au cours de ce travail. Nous présenterons également les résultats obtenus au cours de quatre études expérimentales présentées sous forme d'articles scientifiques acceptés ou soumis dans des journaux internationaux.

Dans un troisième temps, nous tenterons de synthétiser les résultats obtenus au cours de nos expérimentations dans le cadre d'une discussion générale. Nous évoquerons également les perspectives de recherche en lien avec nos résultats et les pistes éventuelles de travaux futurs.

Première partie

REVUE DE LITTERATURE

Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote, oxyde azotique ou oxyde nitrique (NO), est un composé chimique constitué d'un atome d'oxygène lié à un atome d'azote. Cette molécule labile, présente naturellement dans l'organisme, fait l'objet de nombreuses recherches en physiologie depuis les années 80 où elle fut découverte comme une substance vasodilatatrice, appelée alors EDRF (Endothélium-derived relaxing factor), sécrétée par l'endothélium. Ce n'est que par la suite que l'EDRF fut identifié comme étant le monoxyde d'azote, un radical libre gazeux, dérivé de l'oxygène, jouant le rôle de médiateur pour de nombreuses substances relaxantes du muscle lisse vasculaire comme la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, et l'acétylcholine. En 1998, Louis Ignarro, Robert Furchgott et Ferid Murad remportent le prix Nobel de médecine pour leurs travaux qui permettent de mettre en évidence le rôle bénéfique du NO sur la prévention cardiovasculaire et sur l'hypertension artérielle pulmonaire. Les avancées de la recherche qui suivent ce prix Nobel sont majeures, caractérisant le NO comme le seul gaz neurotransmetteur, ayant un rôle vasodilatateur, hypotenseur des muscles lisses, et catalyseur des réponses immunitaires.

Le NO est présent chez de nombreuses espèces animales mammifères comme molécule endogène issue d'une réaction catalysée par une enzyme, la NO synthase (NOS). Cette voie, considérée comme la principale, est complétée par une origine chimique directe résultant d'une simple réduction de l'ion nitrite endogène présent dans le compartiment sanguin. Dans le sang, et les tissus, en condition physiologique, le NO diffuse rapidement dans un rayon d'une centaine de micromètres pour activer localement ses cibles métaboliques, notamment les cellules musculaires lisses. La demi-vie très brève du NO, en tant qu'espèce radicalaire, ainsi que sa très grande diffusibilité à travers les membranes cellulaires permettent la régulation d'effets uniquement transitoires (Nathan, 1992 et 1994). Dès lors qu'il est synthétisé, le NO, au niveau vasculaire, peut, soit réagir avec des métaux comme le fer, le cuivre ou le zinc, permettant ainsi la régulation de l'activité de différentes enzymes, soit être oxydé relativement rapidement en nitrite. De façon indirecte, le NO entraine la formation de S-nitrosothiols ou thionitrite à partir de la cystéine par S-nitrosylation qui va lui-même activer de nombreuses enzymes. Ce nitrosothiol peut également devenir de façon réversible une source de NO au niveau vasculaire et tissulaire. Toujours de manière indirecte, le NO peut agir par réaction rapide

avec l'anion superoxyde, entrainant ainsi la formation de peroxynitrite, qui du fait de son fort pouvoir oxydant est à l'origine de modifications des protéines, lipides et acides nucléiques.

Les effets physiologiques du monoxyde d'azote

→ NO et fonction vasculaire

Le NO, synthétisé par l'endothélium, est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Je me focaliserai ici essentiellement sur la fonction vasomotrice. Elle est contrôlée par la présence de cellules musculaires lisses autour de l'endothélium vasculaire (figure 1) capables de se contracter ou se relâcher afin de faire varier le diamètre artériel. Cette variation de diamètre permet de limiter l'aspect turbulent de la circulation sanguine par maintien de la pression artérielle (PA). Dans des conditions physiologiques, les cellules musculaires lisses sont constamment soumises à une multitude de stimuli nerveux ou humoraux, assurant un équilibre entre relaxation et contraction. Ainsi, ces cellules musculaires lisses ne sont jamais complètement relâchées mais plutôt dans un état semi-contracté. Cet état est appelé " tonus " vasculaire.

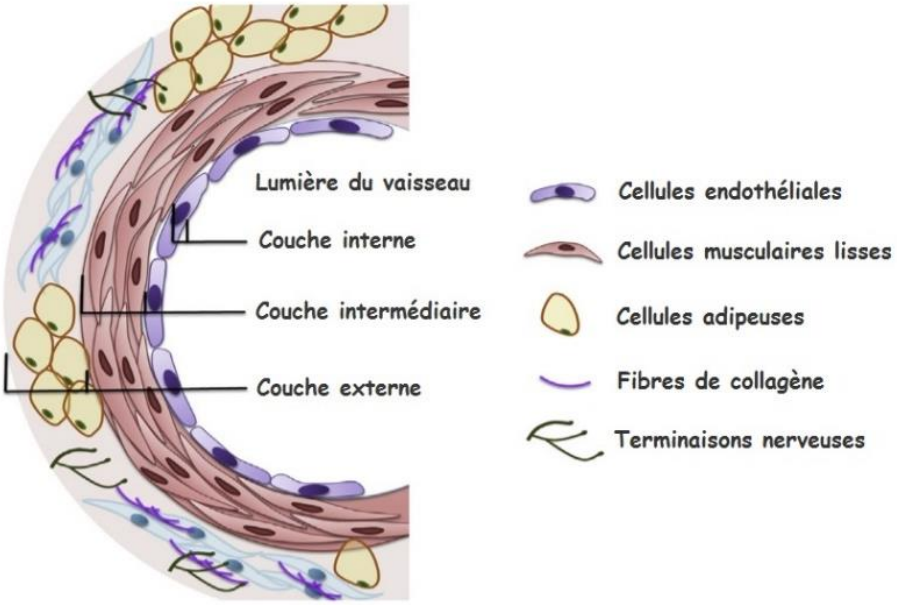
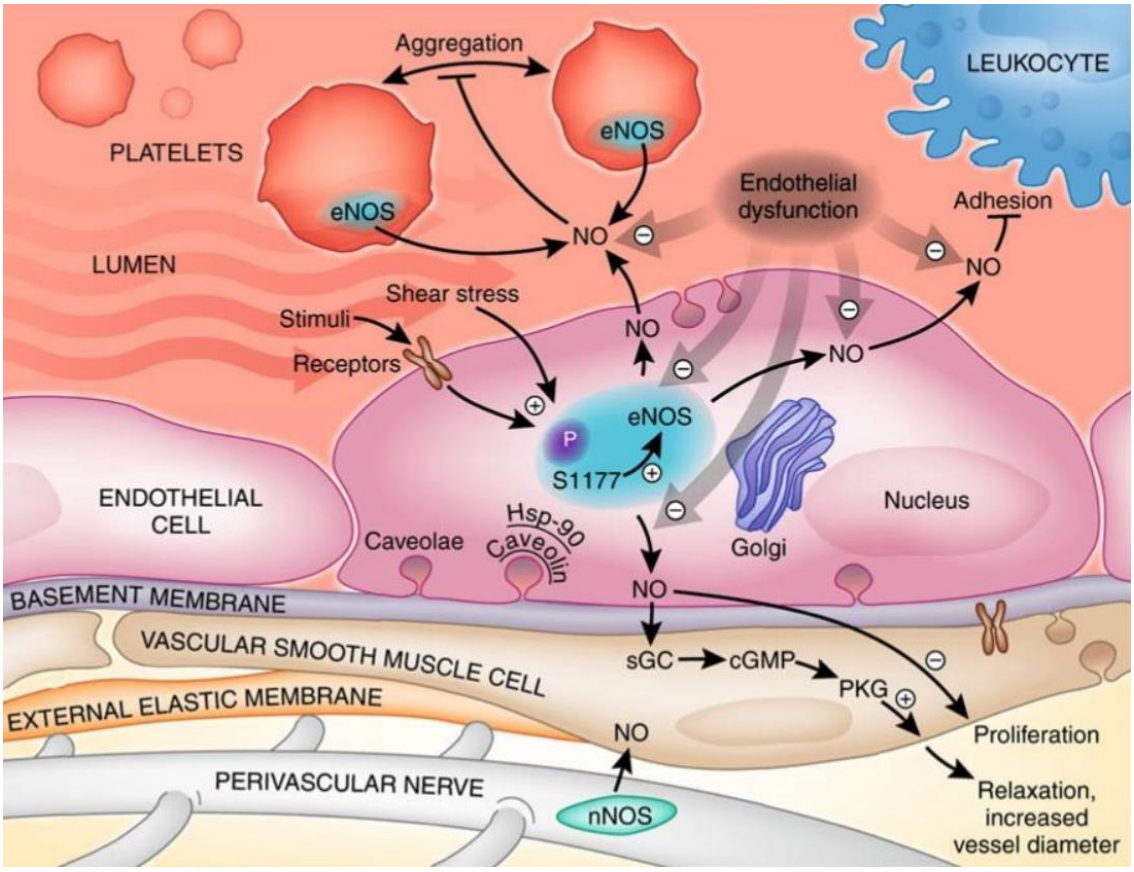


Figure 1. Anatomie d'un vaisseau sanguin (Zhao, Vanhoutte, and Leung 2015)

Le NO exerce un effet de relaxation sur les cellules musculaires lisses par l'intermédiaire d'une cascade de réactions (figure 2). Il réagit avec la guanylate cyclase, produisant de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), second messager. La GMPc active alors la protéine kinase G (PKG). L'effet de l'activation de la PKG sur la relaxation

musculaire est ensuite pluri-factorielle. L'activation de la PKG est responsable de la phosphorylation du phospholambane, ce qui active les pompes SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum calcium-ATPase) du réticulum sarcoplasmique. L'activation de la PKG va également entrainer une hyperpolarisation par activation des canaux potassiques inhibant les canaux calciques voltage dépendant. Ces deux mécanismes limitent la libération de calcium et favorisent sa recapture, ce qui diminue le calcium cytsolique et augmente la relaxation de la cellule musculaire (Beloucif et al., 1991). L'activation de la PKG va également jouer un rôle directement sur le complexe acto-myosine en diminuant la sensibilité au calcium.



NO, monoxyde d'azote; eNOS, NO synthase endothéliale; nNOS, NO synthase neuronale; cGMP, La guanosine monophosphate cyclique ; PKG, protéine kinase G; shear stress ; augmentation des contraintes de cisaillements; sGC, guanylate cyclase.

Figure 2. Effet du NO dans le compartiment vasculaire (Atochin and Huang 2010)

En plus de son effet sur la vasomotricité, au niveau de la lumière vasculaire le NO endogène produit par l'endothélium exerce également un effet antiagrégant permanent. Le NO active la guanylate cyclase plaquettaire, responsable elle-même d'une augmentation des taux de GMPc intracellulaire. La protéine-kinase dépendante du GMPc

est alors activée, conduisant à une diminution du taux de calcium intracellulaire. Cette baisse du taux de calcium inhibe l'expression des protéines GPIIb et GPIIIa situé sur les parois des plaquettes. Ces protéines sont responsables de l'adhésion plaquettaire par interaction avec le fibrinogène (Park et al., 2013). Le fait de limiter l'expression des protéines à l'origine de l'adhésion permet de limiter la formation d'agrégats plaquettaires. Le NO est donc anti-thrombotique.

Ses propriétés vasomotrices et anti-agrégantes font du NO un acteur principal de la fonction vasculaire, impliquée dans la dysfonction endothéliale (Maxwell, 2002; Tousoulis et al., 2012). La diminution de la synthèse endogène de NO est caractérisée cliniquement par une vasoconstriction basale entrainant une augmentation de la rigidité et de la PA, par une prolifération des cellules musculaires lisses, par une augmentation de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des globules blancs, et enfin par une augmentation des phénomènes inflammatoires (Atochin and Huang, 2010).

Le rôle du NO sur la fonction vasculaire chez l'homme a été mis en évidence notamment par l'utilisation de diméthylarginine asymétrique (ADMA) et de N-monométhyl-arginine (L-NMMA), tous deux étant des inhibiteurs endogènes de la synthèse de NO (Caplin and Leiper, 2012). La perfusion d'ADMA cause une augmentation de la résistance vasculaire et une diminution du débit cardiaque, toutes deux accompagnées d'une concentration moindre de GMPc, le principal messager du NO étant impliqué dans le processus de vasodilatation (Kielstein et al., 2004). Ceci a également été confirmé par l'augmentation dose-dépendante de la PA du sujet sain (T. Larsen et al., 2012) et l'augmentation de l'agrégation plaquettaire chez le patient hypertendu (L. R. de Meirelles et al. 2007) causée par la perfusion de L-NMMA.

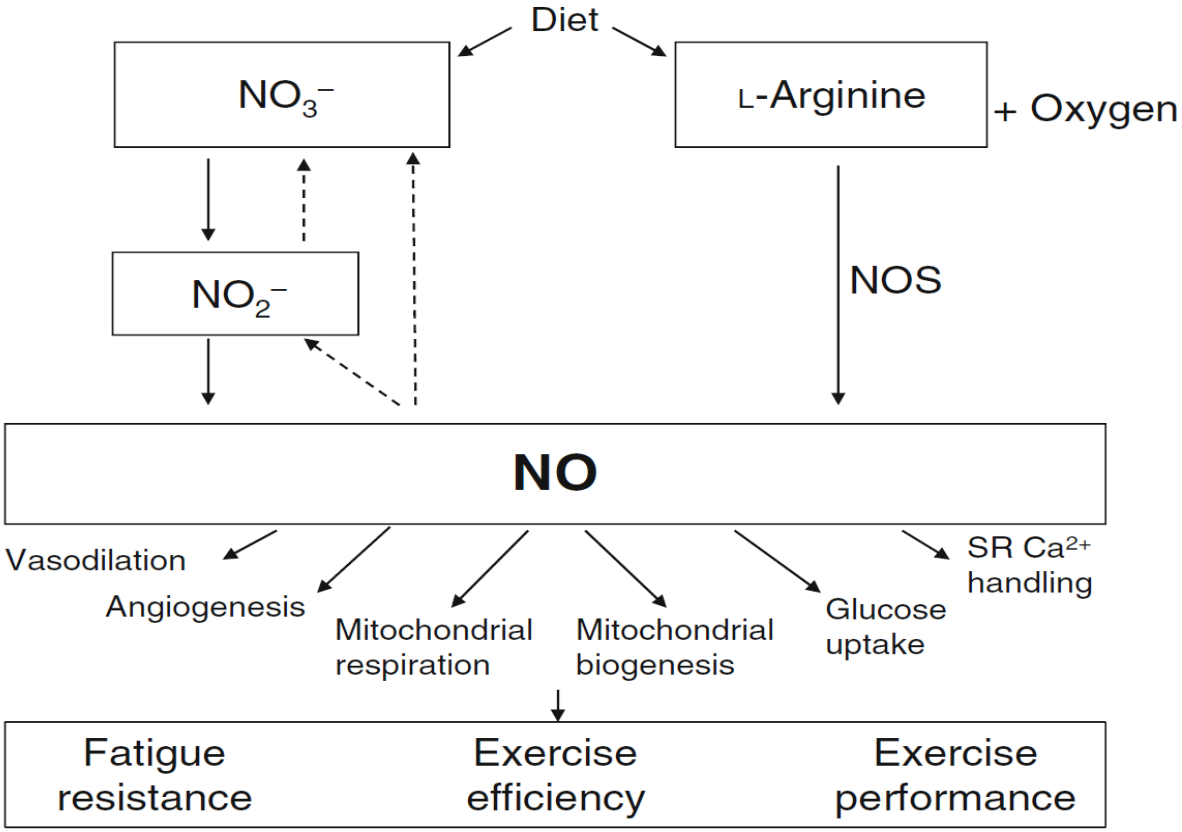
Au niveau cérébral, par son action sur la fonction vasculaire cérébrale, le NO est connu aujourd'hui comme régulateur d'importantes fonctions comme l'apprentissage, la mémoire, la plasticité synaptique et la protection neuronale. Il est considéré comme un neurotransmetteur et neuromodulateur (Dawson and Snyder 1994), et joue un rôle important dans l'autorégulation du débit sanguin cérébral (DSC) (White, Vallance, and Markus, 2000). Sa capacité de neurotransmission le place également comme un acteur principal dans le couplage neurovasculaire, c'est-à-dire la régulation du DSC en fonction de l'activité neuronale (Attwell et al., 2010; Garry et al., 2015). Plusieurs populations de neurones contenant des NOS ont été localisées dans différentes parties du système nerveux central comme le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe et l'hypothalamus.

→ Autres rôles physiologiques principaux du NO

Dans le système digestif, le NO est produit à la fois par les cellules endothéliales mais aussi par les terminaisons nerveuses non adrénergiques et non cholinergiques (origine dite nitrinergique). Une fois libéré, il participe à la régulation de la motricité digestive. En modulant la microcirculation de la muqueuse, il joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale. Produit à fortes concentrations par les cellules immunitaires, le NO exerce une action immunorégulatrice et cytotoxique indirecte (Martín et al., 2001). Il intervient ainsi dans la réponse immunitaire liée à des agents pathogènes directement au sein du tube digestif. D'autres effets importants du NO sont bien connus aujourd'hui, notamment des effets bénéfiques sur le cœur rapportant une diminution des risques d'infarctus, des effets bénéfiques sur les mécanismes physiologiques responsables de l'érection, et un rôle significatif dans le système immunitaire par une action antivirale, antibactérienne et antiparasitaire.

Les voies de synthèse du monoxyde d'azote

La demi-vie courte du NO nécessite une formation endogène rapide et continue pour maintenir sa biodisponibilité. Dans l'organisme, le NO est synthétisé par deux voies de production distinctes (Figure 3). La première est dépendante d'une enzyme, la NO-synthase (NOS), présente sous plusieurs isoformes (la forme principale en physiologie dans l'endothélium est la eNOS), qui catalyse la formation de NO en présence de substrats et cofacteurs spécifiques. Cette voie est qualifiée de NOS-dépendante. La dysfonction de cette voie de production, est la raison principale de la baisse de la biodisponibilité en NO. La deuxième voie, complémentaire à la première, est une voie NOS-indépendante et régule le pool de NO par simple réduction de l'ion nitrite endogène présent dans le compartiment sanguin ou tissulaire (Bescós et al., 2012).



NO; monoxyde d'azote; NO_2^-, nitrite; NO_3^-, nitrate; NOS, NOsynthase.

Figure 3. Les deux voies de production de NO (Bescós et al. 2012)

La voie NOS-dépendante

L'activité de la NOS a été caractérisée comme dépendante de la présence suffisante de substrats, comme la L-arginine, qui est le substrat principal de la réaction de synthèse de NO, et l'oxygène. La L-arginine est un acide-aminé semi-essentiel, qui doit nécessairement être apporté par l'alimentation afin de ne pas être en déficit. Il a aussi été montré que l'activité de la NOS dépendait de la présence de cofacteur comme le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en tant que donneur d'électrons et le tétrahydrobioptérine (BH4) pour stabiliser le complexe. Il existe trois isoenzymes présentant les mêmes facultés de transformation de la L-arginine:

- la NOS-I, ou nNOS ou NOS de type I est présente en quantité dans les neurones et les cellules spécifiques du système nerveux. Elle est qualifiée d'enzyme constitutive car sa concentration reste constante, elle fait partie du pool normal et permanent de la cellule,

- la NOS-III, eNOS, ou enzyme de type III, que l'on nomme l'enzyme constitutive endothéliale. Elle se trouve dans l'endothélium qui tapisse la paroi interne des vaisseaux sanguins,

- la NOS-II, ou iNOS, que l'on qualifie non pas de constitutive mais d'inductible et qui est rattachée au système immunitaire. Elle est dite inductible car elle ne préexiste pas dans les tissus, elle dépend de l'activité des macrophages qui exprime la NOS en présence d'un milieu bactérien.

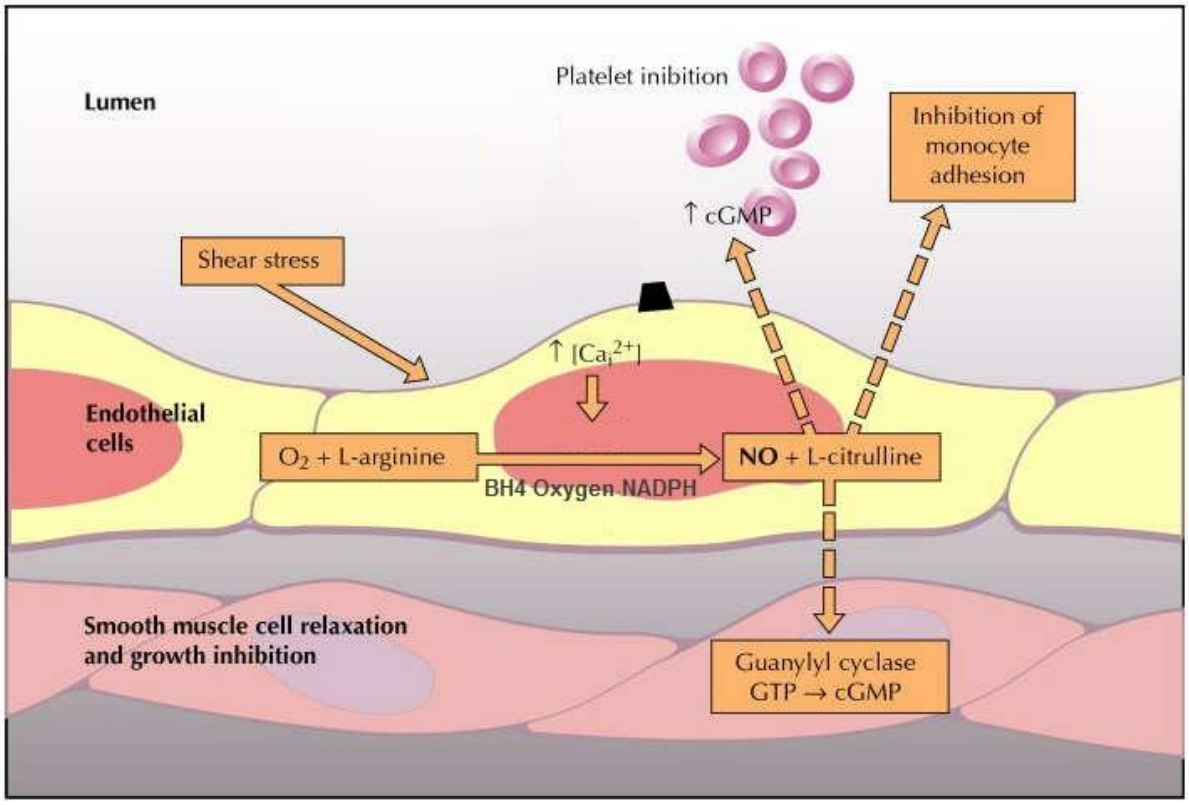


Figure 4 Activation de la monoxyde d'azote synthase (adapté de "Atherosclerosis" 2008)

→ Activation de la NOS

L'activité de la NOS et donc la production de NO, est dépendante de deux facteurs majeurs. Le premier est un facteur nerveux qui induit l'augmentation de la concentration en vasomédiateurs relaxant tel que l'acétylcholine et la bradykinine. Ces neuromédiateurs vont avoir un effet direct en activant la NOS.

Le deuxième est un facteur mécanique et agit au niveau de la membrane des cellules endothéliales par action sur des mécanorécepteurs tels que la caveoline, (García-Cardeña et al., 1997), les intégrines (Tzima et al., 2005) et les canaux ioniques (Schwartz and

Lechene, 1992). Ces mécanorécepteurs sont sensibles aux modifications du débit sanguin induit par une vasoconstriction ou une augmentation du débit vasculaire à diamètre vasculaire constant. Ces modifications entrainent une variation de la contrainte qu'exerce le sang sur l'endothélium et sont identifiées sous le terme de contrainte de cisaillement. En réponse à ces contraintes de cisaillement, les mécanorécepteurs traduisent le stimulus mécanique en une série de stimuli chimiques qui vont aboutir à l'augmentation de l'activité de la NOS (figure 4).

Cette voie NOS dépendante est donc un acteur clef dans la régulation de la biodisponibilité en NO. Bien qu'ayant une activité dépendante de plusieurs facteurs, il a été montré que l'augmentation de L-arginine plasmatique pouvait optimiser la synthèse de NO. De ce fait, il parait évident que toutes interventions nutritionnelles pouvant augmenter la concentration en L-arginine plasmatique peuvent améliorer le fonctionnement des NOS et donc augmenter la biodisponibilité en NO.

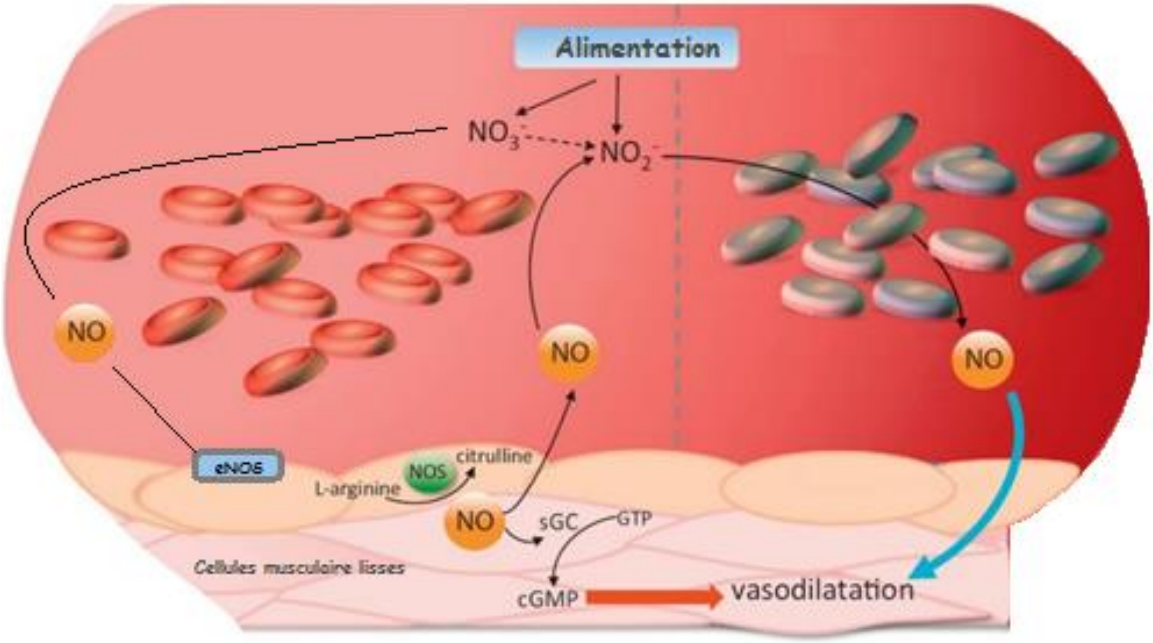
La voie NOS-indépendante

Le nitrate et le nitrite ont longtemps été considérés comme des produits de l'oxydation du NO pouvant être éliminés par les reins, sans jouer de rôle dans les processus physiologiques. Ils sont aujourd'hui des marqueurs, par dosage sanguin et urinaire notamment, utilisés pour évaluer l'activité des NOS. En effet, une fois synthétisés à partir de l'oxydation du NO par l'oxygène, le nitrate et le nitrite plasmatiques peuvent être soit de nouveau réduits en NO, soit excrétés par les reins dans l'urine (Gladwin et al., 2005). Par leur conversion et reconversion possible en NO dans des conditions physiologiques spécifiques, nous considérons aujourd'hui ces deux dérivés nitrés comme des réserves endogènes de NO au niveau vasculaire.

La formation de NO par la réduction du nitrite a été décrite pour la première fois en 1995 (Zweier et al., 1995), en analysant la participation de la NOS dans la synthèse totale de NO, et continue de faire débat aujourd'hui. La formation du NO à partir de la réduction du nitrite s'effectue notamment par la réaction avec l'hémoglobine (Gladwin et al., 2005; Lundberg et al., 2008)(figure 5), et plus précisément la désoxyhémoglobine. Cette dernière présente une activité réductase et catalyse la réduction du nitrite en NO au niveau du centre fer de l'hème (Kim-Shapiro, 2006). La formation de NO par réduction du nitrite augmente de façon concomitante avec d'une part, la diminution locale de la saturation oxygène (Lundberg et al., 2008), et d'autre part l'augmentation de la

concentration en ion hydrogène (Kim-Shapiro et al., 2006). Ceci suggère une régulation par la pression en oxygène et par le pH de la réduction du nitrite en NO. Il a été montré que le niveau maximal de réduction du nitrite en NO était atteint lorsque la saturation artérielle en oxygène de l'hémoglobine atteignait environ 50% (Huang et al., 2005). Il a également été montré que la réduction en NO de l'ion nitrite circulant était plus importante dans des fibres musculaires glycolytiques par leur production accrue d'ions hydrogènes lors de l'exercice (McDonough et al., 2005).

Par ailleurs, d'autres voies de synthèse du NO, via la réduction du nitrite existent au niveau vasculaire. Chez l'homme et l'animal, la production de NO à partir du nitrite est diminuée par inhibition de la xanthine oxydoréductase (Webb et al, 2004). Webb et al., (2008) ont pu identifier la présence de la xanthine oxydoréductase sur la paroi des globules rouges et des vaisseaux sanguins. Tout comme la réduction du nitrite par l'hémoglobine, la réduction du nitrite par la xanthine oxydoréductase est stimulée par une baisse de la saturation et une augmentation de l'acidité du milieu.



NO; monoxyde d'azote; NO_2^-, nitrite; NO_3^-, nitrate; NOS, NOsynthase, cGMP, La guanosine monophosphate cyclique ; sGC, guanylate cyclase.

Figure 5. Voie de production de monoxyde d'azote NOS-indépendante au sein de la lumière vasculaire

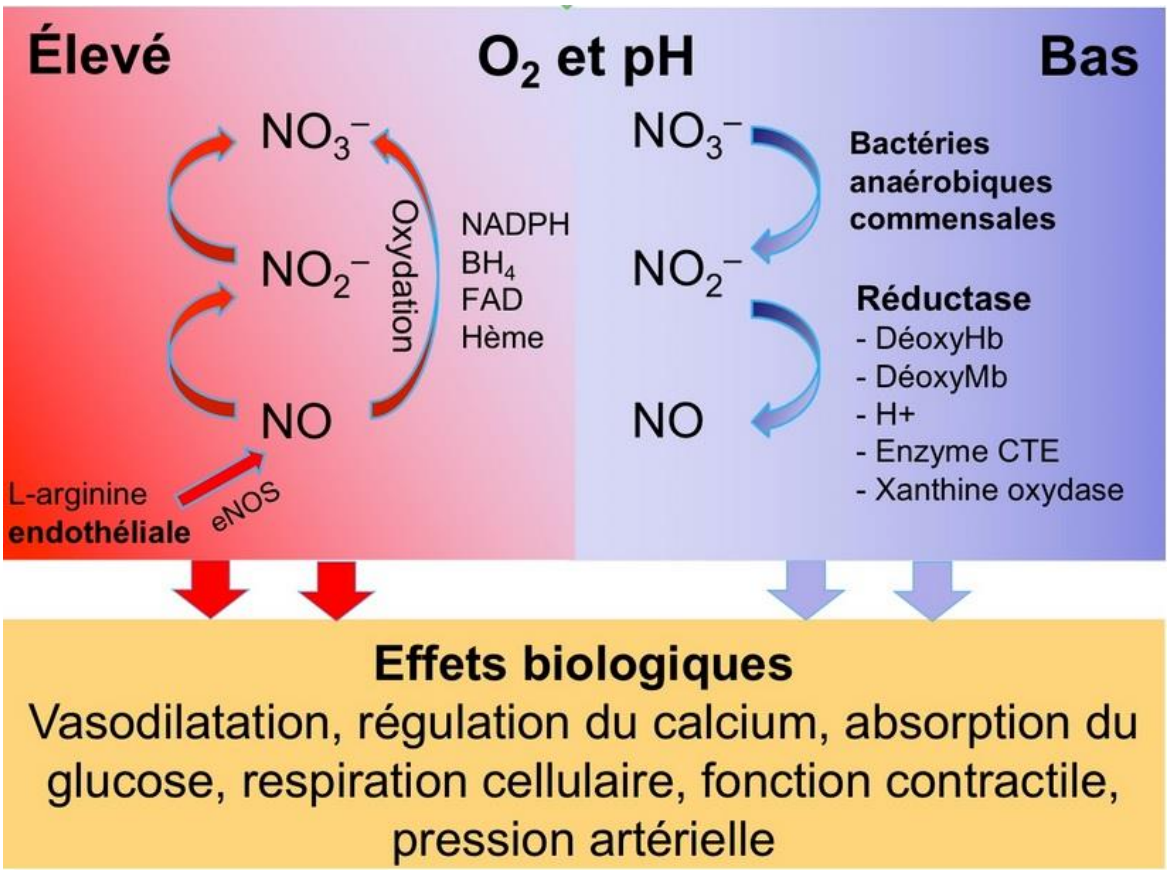
Au niveau intracellulaire, la formation du NO, par le biais de la réduction du nitrite, s'effectue par l'interaction avec la myoglobine. La réduction du nitrite en NO par la myoglobine suit la même équation que celle de l'hémoglobine, et nécessite également une

diminution du pH et une faible saturation en oxygène (Kamga et al., 2012). Cependant, ces réductions restent spontanées par comparaison à celles contrôlées par l'hémoglobine qui est plus prolongée (Shiva et al., 2007). La mitochondrie possède également une activité réductase en mesure de réduire le nitrite en NO, à travers différents mécanismes. La réduction du nitrite peut survenir au niveau de la chaîne de transport des électrons, et plus particulièrement, via le complexe mitochondrial III en présence de substrat (Nohl et al., 2000), et le complexe IV, en présence de cytochrome c et d'un faible pH (Castello et al., 2006). Cette cytochrome C est aussi elle-même en mesure de réduire le nitrite en NO dans conditions d'acidité et d'hypoxie sévère. Néanmoins, la capacité de réduction du nitrite au sein de la cellule musculaire serait déterminée par la pression en oxygène qui elle, est conservée dans la plupart des cas par une affinité importante de la myoglobine pour l'oxygène.

Cette voie NOS indépendante joue donc un rôle non négligeable dans la régulation de la biodisponibilité en NO. Même si la transformation du nitrite en NO est dépendante de conditions spécifiques (désaturation et baisse du pH), la biosynthèse de NO par cette voie NOS-indépendante des nitrites circulants reste notable. De ce fait, il parait évident que toutes interventions nutritionnelles pouvant augmenter la concentration en nitrite et nitrate circulant peuvent améliorer la biodisponibilité en NO.

Un fonctionnement complémentaire

Nous venons donc de décrire les deux voies de production de NO au sein de l'organisme, l'une dépendante de la NOS et l'autre en partie dépendante de l'oxyhémoglobine. Bien que considérées comme indépendantes l'une de l'autre, l'étude de leurs mécanismes de régulation respectifs, montre un facteur commun d'activation/inhibition. Comme le montre la figure 6, la baisse de pression en oxygène et la baisse du pH, vont altérer la voie NOS-dépendante et activer la voie NOS-indépendante. À l'inverse, une pression partielle en oxygène normale ainsi qu'un pH physiologique permettront le fonctionnement normal des NOS mais limiteront la réduction du nitrite en NO. De ce fait, la biodisponibilité en NO semble pouvoir être maintenue en continu par implication respective des deux voies de synthèse, l'une constituant une synthèse basale de NO par les NOS, et l'autre assurant une réponse compensatrice en situation de stress physiologique dû au manque d'oxygène ou au déséquilibre du pH.



NO; monoxyde d'azote; NO_2^-, nitrite; NO_3^-, nitrate; NOS, NOsynthase,

Figure 6. L'équilibre de la synthèse de monoxyde d'azote au sein de l'organisme (Woessner et al. 2018)

Monoxyde d'azote et fonction cérébrale

Au niveau cérébral, le NO est un régulateur d'importantes fonctions, comme la régulation du DSC, la neurotransmission noradrénergique et non-cholinergique, la plasticité synaptique et la protection neuronale (Dawson and Snyder, 1994). De même, au niveau de l'hypothalamus, il stimule la sécrétion d'hormones telles que la GH (Growth Hormon, hormone de croissance) ou la LH (Luteinizing Hormon, hormone lutéinisante).
Le NO est impliqué dans la régulation de tonus vasculaire, régulant ainsi le DSC (Džoljić et al., 2015). Le cerveau est dépourvu de réserves d'oxygène et de glucose, il est donc étroitement dépendant de l'apport extérieur de ces deux substrats énergétiques, lui-même dépendant du DSC. La régulation du DSC repose sur deux mécanismes, le premier étant le mécanisme d'autorégulation, qui va contrôler la pression de perfusion cérébrale globale, ce qui le différencie du deuxième, le couplage neurovasculaire, qui entraine des variations locales du débit en fonction de l'activité neuronale. Ainsi, les capacités de synthèse de NO au niveau cérébral s'avèrent être nécessaires dans la prévention des

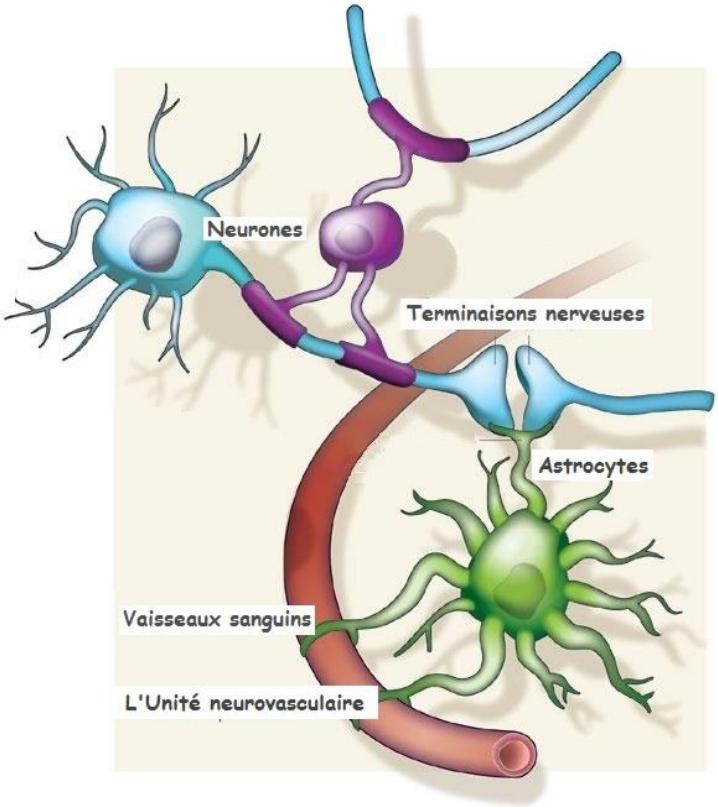
maladies cérébrovasculaires et les risques d'accidents vasculaires cérébraux (Drake and Iadecola, 2007). Ceci est appuyé par le rôle protecteur du NO sur l'inflammation, les risques thrombotiques et l'agrégation plaquettaire.

→ L'autorégulation

La fonction première du mécanisme d'autorégulation est donc de conserver un DSC global physiologique (Paulson, Strandgaard, and Edvinsson, 1990). Le DSC correspond au rapport entre la pression de perfusion et les résistances vasculaires cérébrales. La pression de perfusion cérébrale est évaluée par différence entre PA à l'entrée et pression veineuse cérébrale. La pression veineuse étant considérée comme négligeable, la pression de perfusion cérébrale peut donc être assimilée à la PA systémique. En conditions physiologiques, la pression de perfusion n'influe pas de manière significative sur le DSC, la circulation cérébrale est bien protégée contre les modifications brutales de la PA systémique par les modifications des résistances vasculaires cérébrales. Ces résistances sont dépendantes de plusieurs facteurs comme le tonus vasculaire cérébral, la pression intracrânienne, la viscosité du sang, et l'état anatomique des vaisseaux. Les trois derniers n'étant pas ou très peu altérés en condition physiologique, les résistances vasculaires dépendent donc essentiellement du tonus vasculaire cérébral. Les variations de la pression partielle en oxygène ou en dioxyde de carbone peuvent faire varier le DSC (Mardimae et al., 2012). Alors qu'une hypocapnie provoque une vasoconstriction artérielle et réduit le DSC, une hypercapnie entraîne une vasodilatation et une augmentation du DSC. A l'inverse, une hypoxie, considérée comme sévère (Pression artérielle en oxygène (PaO_2) inférieure à 40-50 mmHg) entraine une vasodilatation et une augmentation du DSC (Mardimae et al., 2012).

→ Le couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire, ou couplage débit-métabolisme, correspond à un mécanisme intrinsèque du cerveau par lequel son apport sanguin peut être localement modifié en fonction des variations de l'activité électrique et métabolique des cellules neuronales (Iadecola, 1993; Lok et al., 2007; Dormanns et al.,2016). Cette fine régulation peut être appréciée par le signal BOLD (de l'anglais blood-oxygen-level dependent) qui correspond à la cinétique de réponse hémodynamique induite dès les premières secondes de la modification de l'activité neuronale (Edvinsson, 1993).



Les astrocytes de l'unité neurovasculaire sont des cellules gliales, assurant la barrière hémato-encéphalique, l'apport de substrats énergétiques aux neurones, le maintien de la structure du système nerveux, mais aussi le couplage neurovasculaire. En plus des eNOS vasculaires et nNOS neuronales, les astrocytes expriment également des NOS, permettant la synthèse de NO en réponse à l'augmentation de l'activité neuronale.

Figure 7. L'unité neurovasculaire (adapté de Colin gerber, 2011))

Il est maintenant généralement accepté que le NO est le principal régulateur de ces deux mécanismes d'adaptations (White et al. 2000; Garry et al. 2015). De la même façon que dans le compartiment vasculaire périphérique, le NO est sécrété par l'endothélium vasculaire cérébral par l'intermédiaire de la eNOS et diffuse, vers les cellules musculaires lisses, entrainant leur relâchement par diminution du calcium cytosolique. En plus de la synthèse endothéliale, le NO semble pouvoir être synthétisé également au niveau des astrocytes (Li, Sul, and Haydon 2003), au niveau des terminaisons nerveuses péri-vasculaires, et au niveau de certains neurones par la nNOS (Wahl et al., 1999). Ainsi, les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires lisses ainsi que l'endothélium forment ensemble l'unité neurovasculaire (figure 7). Cette unité, par l'intermédiaire du NO principalement, maintient le DSC. Chez l'animal, l'inhibition de la synthèse de NO par les

NOS entraine une diminution du DSC de repos (Demchenko et al., 2005), une diminution de la réponse vasodilatatrice hypercapnique (Iadecola and Xu, 1994) et une suppression de la vasodilatation hypoxique (Takuwa et al., 2010). Ceci a également pu être démontré chez l'homme, notamment par une diminution de la vasodilatation cérébrale induite par l'hypercapnie chez le sujet sain après perfusion de L-NMMA (Schmetterer et al., 1997). À l'inverse, chez le patient ayant une réponse cérébrale à l'hypercapnie altérée, la perfusion de L-arginine a pour effet de compenser cette altération et d'augmenter la vasodilatation (Zimmermann and Haberl, 2003). La perfusion de L-NMMA altère également la vasodilatation cérébrale hypoxique chez le sujet jeune en bonne santé (Van Mil et al., 2002).

Monoxyde d'azote et performance à l'exercice

Il existe une relation inverse entre l'intensité et la durée d'un exercice (Burnley and Jones, 2007), directement liée aux capacités de production d'énergie de l'organisme (Morton, 2006). De ce fait, en fonction de la demande bioénergétique, Domínguez et al. (2018) proposent de différencier les différents types d'effort par la durée d'exercice, et identifie trois grandes catégories : les efforts explosifs, les efforts de haute intensité, et les efforts d'endurance (Chamari and Padulo, 2015). La performance dans chacun de ces efforts dépend de différents facteurs physiologiques, et notamment de l'efficience de chaque voie de production d'énergie sensible à la présence ou l'apport des substrats énergétiques correspondants.

Dans les types d'effort considérés de longue durée, dépendant principalement des capacités oxydatives, la performance à l'effort est dépendante, entre autre, de l'augmentation du débit cardiaque, puis du débit sanguin musculaire (Bassett and Howley, 2000), lui-même dépendant de la vasodilatation au niveau local (Richardson et al., 1993). Ce mécanisme adaptatif permet un apport augmenté en substrats énergétiques tel que l'oxygène ou le glucose en réponse à l'augmentation de leur consommation. Plusieurs mécanismes entrainent la vasodilatation d'exercice :

- L'augmentation de l'activité du système nerveux central dès le début de l'exercice induit une vasoconstriction périphérique généralisée par action de la noradrénaline sur les cellules musculaires lisses. À l'inverse, au niveau de la masse musculaire mise en jeu, les fibres sympathiques à effet vasoconstricteurs sont inhibées (sympatholyse

fonctionnelle) tandis que celles à effet vasodilatateur sont stimulées, ce qui induit une vasodilatation locale.

- La diminution du contenu artériel en oxygène entraine une vasodilatation musculaire. Ce phénomène est appelé vasodilatation compensatrice et adapte le débit sanguin à la consommation d'oxygène locale (Joyner and Casey, 2014).

- L'augmentation du débit sanguin à l'effort, ainsi que le phénomène de compression induit par les contractions musculaires répétées augmentent les contraintes de cisaillement endothéliales, entrainant ainsi une vasodilatation (Hong and Kim, 2017).

Ces trois mécanismes distincts, responsables de la vasodilatation induite d'exercice convergent vers un produit final commun : le NO.

Plusieurs études chez le sujet sain ont mis évidence que la présence de NO était non-obligatoire dans l'hyperémie d'exercice (Chrage et al., 2004; Rådegran and Saltin, 1999). Ceci est contredit par l'augmentation exercice-dépendante des acteurs endogènes initiant la production de NO comme l'acétylcholine ou la bradykinine (Nosarev et al., 2015) et par la réduction de 20 % du débit sanguin musculaire à l'exercice en réponse l'inhibition des NOS (S, chrage et al., 2004). Ces données supportent les résultats obtenus par Wray et al. (2011) montrant une diminution de 70% de la vasodilatation d'exercice dans le muscle de l'avant-bras après perfusion de L-NMMA. Ils expliquent cette diminution par modification de la vasodilatation dépendante des contraintes de cisaillement. En effet la modification flux-dépendante des contraintes de cisaillement semble induire des modifications de la phosphorylation des NOS, appuyant ainsi le rôle du NO (Casey et al., 2017). En considérant l'ensemble de ces résultats, le NO semble être un des acteurs, au moins de façon partielle, de la vasodilatation induite par l'exercice.

Indépendamment du tonus vasculaire, le NO joue un rôle dans la contraction musculaire du muscle strié squelettique par différentes actions sur le couplage excitation-contraction ou l'homéostasie des substrats énergétiques (Stamler and Meissner, 2001) :

- La perfusion de L-NMMA sur une fibre musculaire isolée a montré une diminution de la consommation de glucose pendant la contraction et ainsi une baisse de la production de force (Merry, Lynch, and McConell 2010).

- Le NO entraine également une augmentation de la force de contraction par action sur le réticulum sarcoplasmique au sein de la cellule musculaire, induisant l'augmentation du calcium cytosolique (Viner, Williams, and Schöneich, 2000 ; Hernández et al., 2012)

- Le NO inhibe de façon réversible la respiration mitochondriale du muscle squelettique, par compétition avec l'oxygène sur le site de fixation du cytochrome oxydase (Borutaité and Brown, 1996). Cependant, cet effet à première vue négatif, serait accompagné par un effet bénéfique sur la phosphorylation oxydative, démontré sur des cellules cardiaques par une diminution du rapport adénosine triphosphate (ATP)/oxygène après inhibition des NOS (Shen et al., 2001).

Le NO semble donc impliqué de façon importante dans la performance à l'effort physique. D'une part, son rôle dans la vasodilatation induite d'exercice qui permet d'augmenter l'apport en substrat énergétique montre son implication dans les exercices de longue durée. L'augmentation des capacités oxydatives permise par l'apport supérieur en substrat énergétique pourrait potentiellement diminuer la fatigabilité lors d'effort d'endurance, et augmenter les capacités de récupération dans les phases à basse intensité d'un effort intermittent. D'autre part, l'action directe du NO sur la contractilité musculaire montre son implication, non seulement dans les efforts de longue durée, mais aussi dans les efforts explosifs et les efforts de hautes intensités.

À retenir sur le chapitre « Le monoxyde d'azote (NO) »

☺ Le NO est une espèce réactive de l'oxygène, constituée d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène.

☺ Le NO est synthétisé par deux voies de synthèse bien distinctes. Une voie enzymatique, produisant du NO par l'action d'une enzyme, la NOsynthase, à partir de la L-arginine, et une voie non-enzymatique, produisant du NO par réduction du nitrite circulant en NO. La synthèse de NO par ces deux voies est dépendante de la pression en oxygène et de l'acidité du milieu.

☺ Le NO est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Son rôle principal est un rôle vasodilatateur dans le compartiment vasculaire central et périphérique. Il intervient également dans le fonctionnement métabolique de la cellule et notamment au niveau du muscle strié squelettique.

☺ La dysfonction endothéliale est un des facteurs initiateurs principaux de la pathogénèse des complications cardiovasculaires et cérébrovasculaires.

➔ L'augmentation de la biodisponibilité en NO pourrait jouer un rôle à la fois thérapeutique et ergogénique.

La biodisponibilité en NO

La biodisponibilité se définit comme étant la fraction de la dose de médicament ou de nutriment ingéré qui atteint le compartiment sanguin. Au regard de la forme gazeuse et de la demi-vie très courte du NO, nous ne pouvons pas parler de biodisponibilité du NO lui-même. Ce terme sera donc employé durant tout ce travail pour définir la quantité de substrat ou cofacteur capable d'induire une synthèse de NO, soit par la voie NOS-dépendante, soit la voie NOS-indépendante. Autrement dit, nous parlerons d'une biodisponibilité accrue de NO, dans le cas d'une augmentation de la concentration plasmatique de nitrite et de L-arginine pouvant être à l'origine d'une augmentation spontanée et régulée de la synthèse de NO.

L'objectif de ce chapitre est de se focaliser sur les différentes interventions capables d'augmenter la concentration plasmatique de L-arginine et de nitrites circulants. Nous nous focaliserons uniquement sur les interventions nutritionnelles passant soit par l'ingestion d'aliments, soit par l'ingestion de compléments alimentaires enrichis.

Augmentation par la voie NOS-dépendante

La voie de synthèse prédominante de NO au sein de l'organisme est la voie dite NOS-dépendante. Celle-ci est constamment active, produisant ainsi du NO en continu par les NOS, que ce soit au niveau de l'endothélium, de l'hémoglobine ou au sein du neurone. Nous savons que l'activation de la NOS est plurifactorielle. Dans des conditions normales, c'est-à-dire un contenu artériel et cellulaire en oxygène, ainsi qu'un pH physiologique, la NOS est capable de transformer la L-arginine en NO en présence d'oxygène, de BH4 et de NADPH. La L-arginine est alors considérée comme son substrat, tandis que l'oxygène, le BH4 et le NADPH sont considérés comme des cofacteurs essentiels. Il a été montré qu'en présence de ces cofacteurs, le niveau d'activité de la NOS était L-arginine-dépendant (Palmer et al., 1988; Hardy and May, 2002).

La L-arginine est un acide aminé faisant partie des 20 acides aminés protéinogènes. Considéré comme semi-essentiel il doit être apporté en quantité suffisante dans l'alimentation pour ne pas être en déficit. La L-arginine est le substrat de la NOS, mais est aussi le substrat d'autres enzymes telles que la L-arginine/glycine amidinotransférase qui intervient dans le métabolisme de la créatine, l'arginase impliquée dans le cycle de l'urée

ou la L-arginine décarboxylase impliquée dans la synthèse d'agmatine (figure 8)(Guoyao Wu et al. 2009).

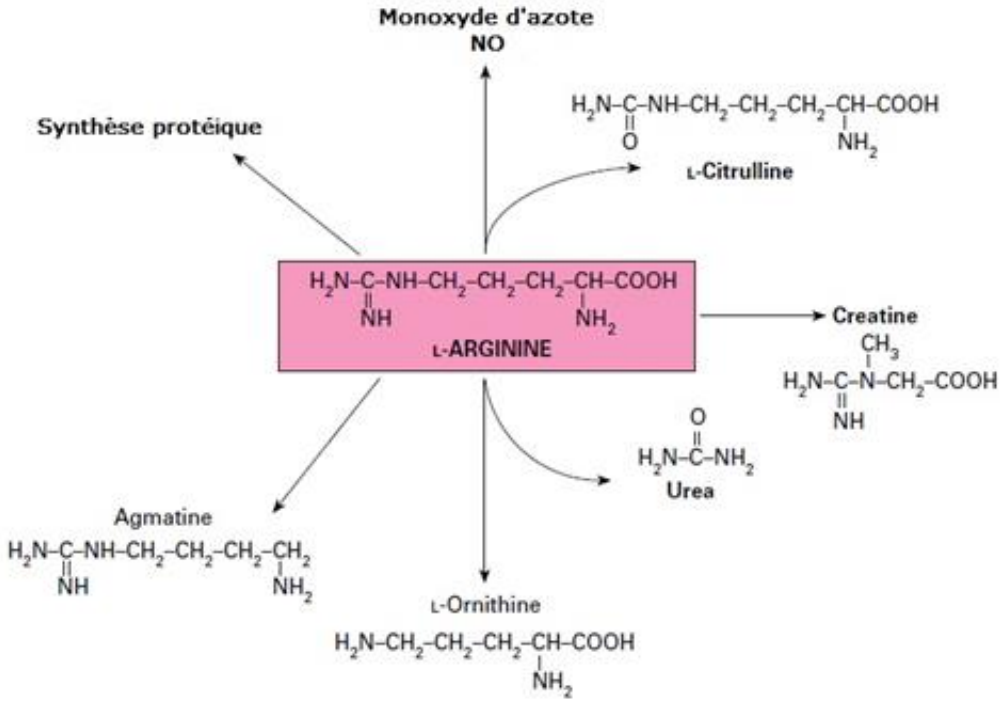


Figure 8. La L-arginine : un substrat enzymatique (adapté de Wu and Morris, 1998)

La concentration plasmatique en L-arginine

Au sein de l'organisme sa présence dépend de sa synthèse endogène, de son apport par l'alimentation et de la dégradation des protéines.

→ La synthèse endogène

La synthèse endogène de L-arginine au niveau systémique est issue d'une interaction entre l'intestin et les reins. Une succession de réactions enzymatiques permet la synthèse de L-citrulline à partir de glutamine, proline, ou d'ornithine (figure 9). Cette L-citrulline une fois synthétisée, est amenée jusqu'aux reins où elle est transformée en L-arginine par l'action de l'argininosuccinate synthase et de l'argininosuccinate lyase (G. Wu and Morris 1998). La L-citrulline est majoritairement transformée en L-arginine au niveau des reins, mais l'argininosuccinate synthase et de l'argininosuccinate lyase sont également présentes dans différents tissus, et notamment l'intestin et le foie. Cette formation endogène de L-arginine est dépendante de la biodisponibilité en L-citrulline (El-Hattab et al. 2012).

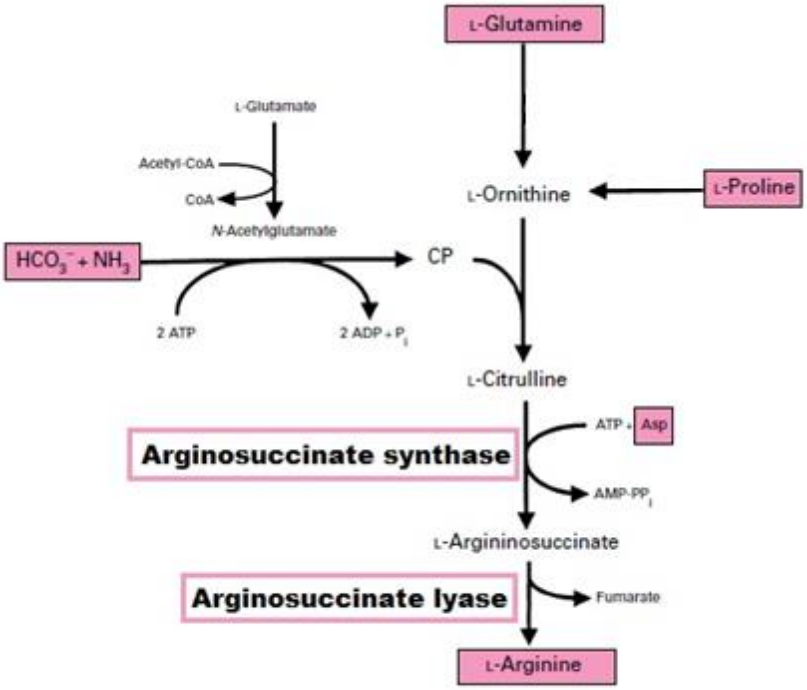


Figure 9. Synthèse endogène de L-arginine (adapté de Wu and Morris, 1998)

→ L'apport exogène de L-arginine

L'apport par l'alimentation est possible par sa présence dans de nombreux aliments consommés régulièrement telles que les légumineuses, certaines céréales, la viande, le poisson ainsi que les produits laitiers. Depuis la découverte de son rôle sur la santé, ou son rôle sur la vasodilatation notamment à l'exercice, la L-arginine est aussi utilisée sous forme de complément alimentaire. Tangphao et al. (1999) ont mis en évidence une variation de la concentration plasmatique au cours de la journée dépendante des repas. Ils ont également pu montrer que la prise orale de 7 g de L-arginine augmentait de 40% la concentration plasmatique en L-arginine. Ces résultats sont cohérents avec les différentes études de pharmacodynamique montrant une augmentation systématique de la concentration plasmatique de L-arginine après supplémentation (Cynober, 2007; Bode-Böger et al., 1998).

La supplémentation en L-arginine

Alvares et al. (2012) ont mis en évidence une augmentation du volume sanguin musculaire chez le sujet sain sédentaire après une supplémentation aigüe de 6 g de L-arginine. Ces résultats confirment les travaux de synthèse de Preli et al., qui, en 2002,

mettaient en exergue les effets bénéfiques de L-arginine sur la circulation sanguine tant chez des modèles animaux que chez le sujet sain (Preli, Klein, and Herrington 2002). Ces résultats sont cependant contradictoires aux résultats de recherches plus récentes (Alvares, Conte-Junior, et al. 2012; Vanhatalo et al. 2013) ne montrant aucun effet de la prise aigüe de 6 g de L-arginine, ni sur la biodisponibilité en NO, ni sur la performance. Contrairement à la prise aigüe, la prise chronique de L-arginine semble augmenter davantage la L-arginine plasmatique et ainsi optimiser le fonctionnement de la NOS. Dans le cas d'une supplémentation chronique, qui correspond à une prise quotidienne minimum de 6 g de L-arginine, la majorité des études montre des effets bénéfiques notamment sur la santé. La supplémentation en L-arginine induit une diminution de 15% de la PA pulmonaire chez le patient hypertendu (Morris et al., 2003), et améliore la dysfonction endothéliale chez les transplantés cardiaques (Doutreleau et al. 2010). Ces résultats accompagnent ceux obtenus par Dong et al. (2011) montrant qu'une prise de L-arginine de 20 et 4 g par jour diminuait respectivement la PA chez le sujet sain et des sujets ayant une moyenne de PAS d'environ 138 mmHg.

Au regard de la performance sportive, les résultats semblent également controversés. La prise quotidienne de 6 g de L-arginine pendant 28 jours n'a aucun effet sur la performance sportive d'athlètes entrainés (Sunderland, Greer, and Morales, 2011). L'absence d'effet se retrouve autant sur la production de force musculaire de sujet sain actif (Alvares, Conte, et al. 2012), que pendant un exercice de résistance de type anaérobie chez l'adulte entrainé (Liu et al., 2009) et chez l'enfant (Tang et al., 2011). A l'inverse, l'étude de Bailey et al. en 2010 a montré qu'une prise aigüe de 6 g de L-arginine avant l'effort faisait augmenter les performances de 9 sujets masculins sédentaires en induisant notamment une PA plus basse, une concentration plasmatique en nitrite plus élevée, une consommation d'oxygène sous maximale moins élevée et un temps d'épuisement plus important (Bailey et al., 2010).

Les effets thérapeutiques et ergogéniques de la supplémentation en L-arginine doivent donc être nuancés. Les études de pharmacodynamique plus récentes, ont montré que l'augmentation de L-arginine plasmatique après la prise orale de L-arginine était relativement faible (Schwedhelm et al. 2008a; Moinard et al. 2016). La L-arginine, une fois ingérée, semble subir une élimination bactérienne et enzymatique systémique au niveau de l'intestin (Morris, 2004), ce qui limiterait son accumulation dans le compartiment sanguin. Au niveau du foie, de façon pré-systémique cette fois-ci, la L-arginine semble être

directement métabolisée par l'arginase, ce qui l'empêcherait d'atteindre le compartiment sanguin. Cette faible biodisponibilité de L-arginine pourrait en partie expliquer l'absence d'effet de la prise de L-arginine retrouvée dans plusieurs études de la littérature.

Quelle dose en supplémentation orale ?

Différentes études ont évalué la consommation moyenne dans la population générale de différents pays et ont conclu que la quantité de L-arginine ingérée quotidiennement était de 3.8 à 7.5 g par jour (Mirmiran et al., 2016; King, Mainous, and Geesey, 2008; Wells, Mainous, and Everett, 2005). Une de ses études a mis évidence que sur 2271 personnes évaluées, il existait une relation entre la quantité de L-arginine consommée par l'alimentation et la concentration plasmatique de nitrate et nitrite, considérés comme un marqueur du fonctionnement des NOS (Mirmiran et al., 2016). Cependant cette relation ne devenait significative que pour des doses de 6,33 g de L-arginine consommées par jour. Concernant la supplémentation, l'augmentation du fonctionnement des NOS est plus importante avec une dose de 4,9 g qu'avec une dose de 1,8 g de L-arginine (Mariotti et al., 2013). De façon globale, les études montrent une quantité de L-arginine plasmatique et une biodisponibilité en NO dépendante de la quantité de L-arginine ingérée, pour des doses allant de 3 g à 15 g par jour. Cependant, la L-arginine, prise à forte dose, entraine des dérangements gastro-intestinaux. Ces effets secondaires restent rares pour des doses comprises entre 3 et 6 g et apparaissent fréquemment pour des doses proches de 9 g (Grimble, 2007). Ces données sont confirmées par un fort taux d'intolérance relevé chez le sujet sain après la prise de 13 g de L-arginine contrairement à la prise de 5 et 9 g (Collier, Casey, and Kanaley, 2005). Pris dans leur ensemble, les résultats des différentes études sur la supplémentation en L-arginine montrent des effets positifs pour des doses comprises entre 5 et 9 g par jour. Ceci doit être pondéré en fonction de la population étudiée, du fait notamment des effets secondaires au niveau gastro-intestinal. Ainsi, une attention particulière semble devoir être portée chez le sportif, et notamment le sportif d'endurance souvent sujet aux dérangements gastriques en lien avec l'ischémie digestive d'exercice (Granger, Holm, and Kvietys, 2015).

La supplémentation en L-citrulline

La L-arginine est issue d'une cascade de réactions aboutissant à une réaction de transformation de la L-citrulline en L-arginine par l'argininosuccinate synthase et de l'argininosuccinate lyase. De ce fait, l'augmentation de L-citrulline au niveau systémique semble être une stratégie intéressante pour augmenter la concentration plasmatique de L-arginine. Les études de pharmacodynamique citées précédemment ont pu mettre en évidence que la supplémentation en L-citrulline faisait augmenter la concentration de L-arginine plasmatique de façon plus importante que la supplémentation de L-arginine elle-même (Schwedhelm et al. 2008a; Moinard et al. 2016) (figure 10).

La L-citrulline est un acide aminé non essentiel et non protéinogène, considéré pendant de nombreuses années comme un intermédiaire du cycle de l'urée et comme un simple acide aminé parmi d'autres. Avant d'être identifiée comme précurseur de L-arginine, la L-citrulline a été longtemps utilisée comme marqueur du fonctionnement des intestins, car elle serait produite de façon significative par celui-ci (Windmueller and Spaeth, 1981). Son implication dans la synthèse de L-arginine, notamment dans le compartiment vasculaire, place la L-citrulline comme un précurseur indirect de NO. Une étude récente (Ochiai et al. 2012a) a pu montrer une augmentation de la production de NO après une prise aigüe de 5,6 g de L-citrulline par jour pendant 7 jours chez des sujets sains. Ces données renforcent les résultats ayant montré une augmentation de l'excrétion urinaire de nitrate et de GMPc après une supplémentation aigüe en L-citrulline (Schwedhelm et al. 2008a).

De nombreuses études ont pu montrer que cette augmentation de NO L-citrulline-dépendante pouvait avoir un effet bénéfique sur la santé. Chez le patient insuffisant cardiaque, la supplémentation chronique de 4 mois (Balderas-Munoz et al., 2012) et 2 mois (Orea-Tejeda et al., 2010) en L-citrulline permet d'améliorer l'éjection systolique du ventricule gauche et la fonction endothéliale.

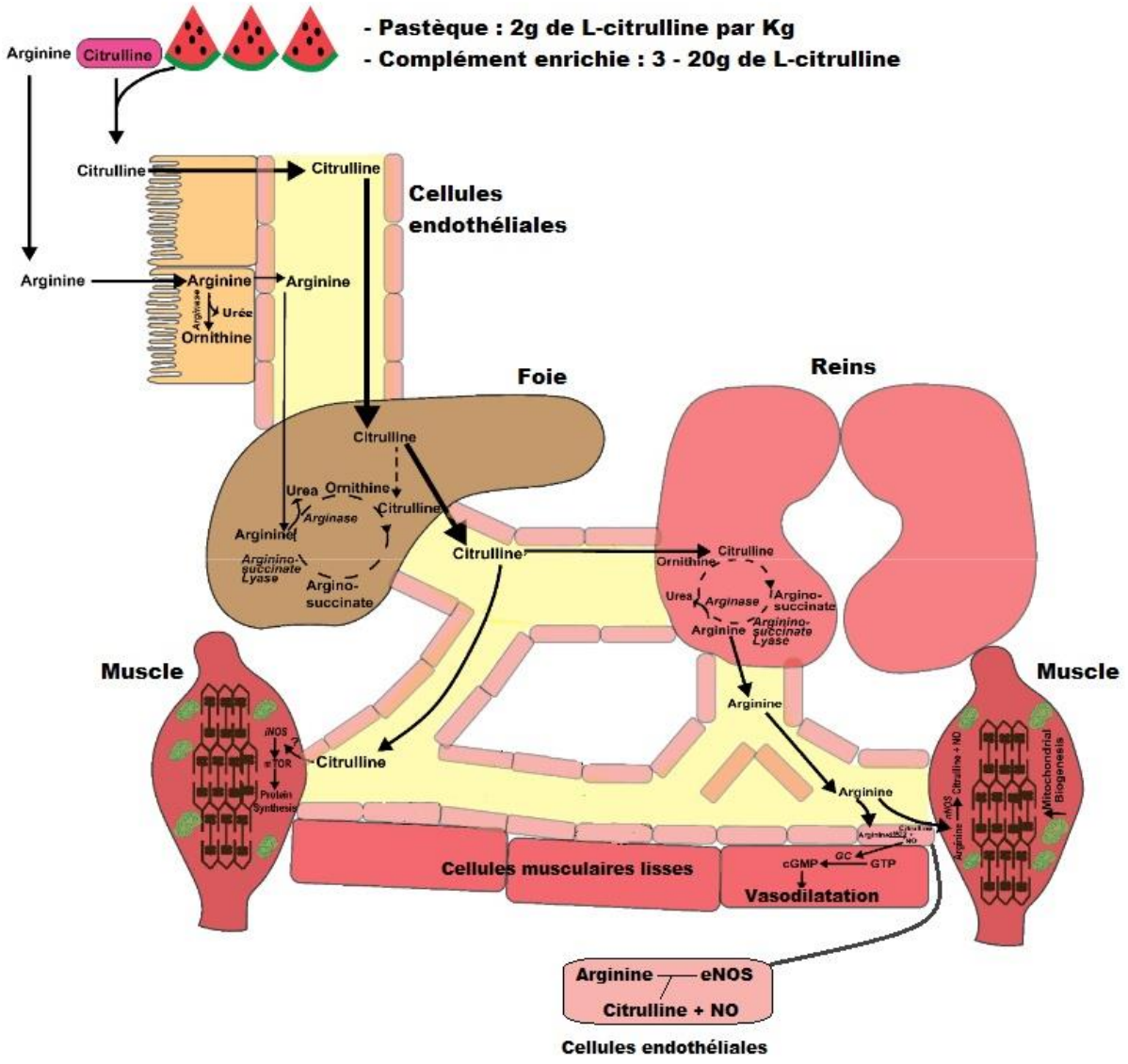


Figure 10. Métabolisme de la L-citrulline (adaptée de Allerton et al. 2018)

Une consommation de L-citrulline (6 g/jour) pendant 6 semaines entraine une diminution de la PA chez le patient obèse hypertendu (Figueroa et al., 2012). De la même façon, chez le sujet sain, des études ont mis en évidence une diminution de la rigidité artérielle ((Ochiai et al. 2012a)) et une limitation de la vasoconstriction induite par le froid (Figueroa et al., 2010) après une supplémentation aigüe en L-citrulline. La littérature relative à la L-citrulline rapporte donc des effets dans la plupart du temps bénéfiques, notamment sur la vasodilatation, que ce soit en prise aigüe ou en prise chronique.

Ces effets positifs restent cependant à confirmer en termes de performance à l'effort. En 2011, l'une des premières études, menée par Takeda et al. (2011) chez l'animal, a montré

que la prise de 6 g de L-citrulline permettait d'augmenter l'endurance à l'effort lors d'un exercice de nage. Chez l'homme, deux méta-analyses ont conclu que la prise de L-citrulline en aigüe ou en chronique n'augmentait pas systématiquement la performance. Alors que Sureda and Pons (2012) expliquent ces résultats controversés par l'effet du niveau d'entrainement des sujet inclus, Figueroa et al. (2017) mettent en avant l'intérêt d'une prise chronique comparée à une prise aigüe. De la même manière que pour la L-arginine, les études disponibles sur les effets de la supplémentation en L-citrulline sur la santé ou la performance sportive restent unanimement controversées.

Quelle dose en supplémentation orale ?

D'après nos connaissances, seulement deux études ont évalué le comportement de la concentration en L-citrulline et L-arginine après l'ingestion de L-citrulline (Moinard et al. 2008; Schwedhelm et al. 2008a). Ces études ont mis en évidence une augmentation de la concentration plasmatique en L-arginine plus importante après ingestion de L-citrulline, qui atteint un pic maximal après 2 h, et reste élevée jusqu'à 8 h après la prise. Moinard et al. (2008) ont évalué l'effet de quatre doses différentes, 2, 5, 10 et 15 g de L-citrulline. Le premier constat est que la supplémentation en L-citrulline, y compris une dose de 15 g, n'entraine pas de dérangement gastro-intestinal contrairement à une supplémentation identique de L-arginine. Le deuxième constat est que la concentration plasmatique en L-citrulline augmente de façon dose-dépendante étant multipliée par 10 et par 100 après l'ingestion respective de 2 et 15 g de L-citrulline. Cette augmentation dose dépendante ne se retrouve cependant pas pour l'augmentation de la concentration plasmatique en L-arginine. En effet, la relation entre la L-citrulline ingérée et la L-arginine plasmatique semble exister uniquement dans le cas d'une prise de 2, 5, et 10 g de L-citrulline, ce qui semble indiquer une saturation de la capacité de transformation de L-citrulline en L-arginine. Ceci se confirme par l'augmentation de l'excrétion urinaire de L-citrulline. Parallèlement, l'étude de (Schwedhelm et al. 2008a) a montré que l'augmentation plasmatique de L-arginine, et l'augmentation conséquente de biodisponibilité en NO évaluée par dosage urinaire de GMPc, était significative dès la prise de 3 g de L-citrulline. En considérant uniquement les études qui ont montré un effet bénéfique d'une supplémentation en L-citrulline sur la santé ou l'exercice, la dose moyenne considérée comme suffisante pour augmenter la biodisponibilité en NO semble être d'environ 6 g (Allerton et al., 2018). Pris dans leur ensemble, les résultats des

différentes études montrent que la supplémentation en L-citrulline semble intéressante pour des doses comprises entre 3 et 10 g par jour. Cependant, l'efficacité de la supplémentation en L-citrulline s'avère être en partie dépendante des capacités rénales de transformation de L-citrulline en L-arginine.

Augmentation par la voie NOS-indépendante

Nous avons pu identifier précédemment que le NO, qui était synthétisé de façon endogène par la voie NOS-dépendante, était ensuite oxydé sous une forme plus stable, les ions nitrites et les ions nitrates (Dejam et al., 2005). Ces deux anions sont considérés comme les produits de la voie NOS-dépendante et la mesure de leur concentration plasmatique est utilisée comme un marqueur biologique du fonctionnement des NOS. L'augmentation de l'ion nitrate et l'ion nitrite au niveau plasmatique devient alors une réserve potentielle de NO et d'oxyde d'azote par une série de réduction (J. O. Lundberg et al. 1994; Benjamin et al. 1994). Ce pool plasmatique de nitrite et de nitrate circulant est donc maintenu par la synthèse endogène de NO, mais peut être aussi dépendant de l'apport exogène de nitrate par l'alimentation (Ysart et al., 1999). Le nitrate est présent en grande quantité (250 mg/4 mmol (62 mg/mmol) pour 100 g de légume frais) dans certains légumes verts tels que la salade, les épinards, les blettes, mais aussi dans les légumes racinaires comme la betterave. L'ingestion moyenne de nitrate est de 31-185 mg/jour en Europe et de 40-100 mg/jour aux États-Unis (Hord, Tang, and Bryan, 2009). Cette source exogène est naturellement considérée comme significative car elle représente la source majeure de nitrate et nitrite au sein de l'organisme (Jon O. Lundberg and Weitzberg, 2009). Le potentiel de synthèse de NO par cette voie NOS-indépendante est donc dépendant de la réserve en nitrate et nitrite. Plus précisément, le nitrite étant la forme la plus réactive capable d'être réduite directement en NO, la synthèse de NO par la voie NOS-indépendante est finement dépendante de la concentration plasmatique de nitrite (figure 11).

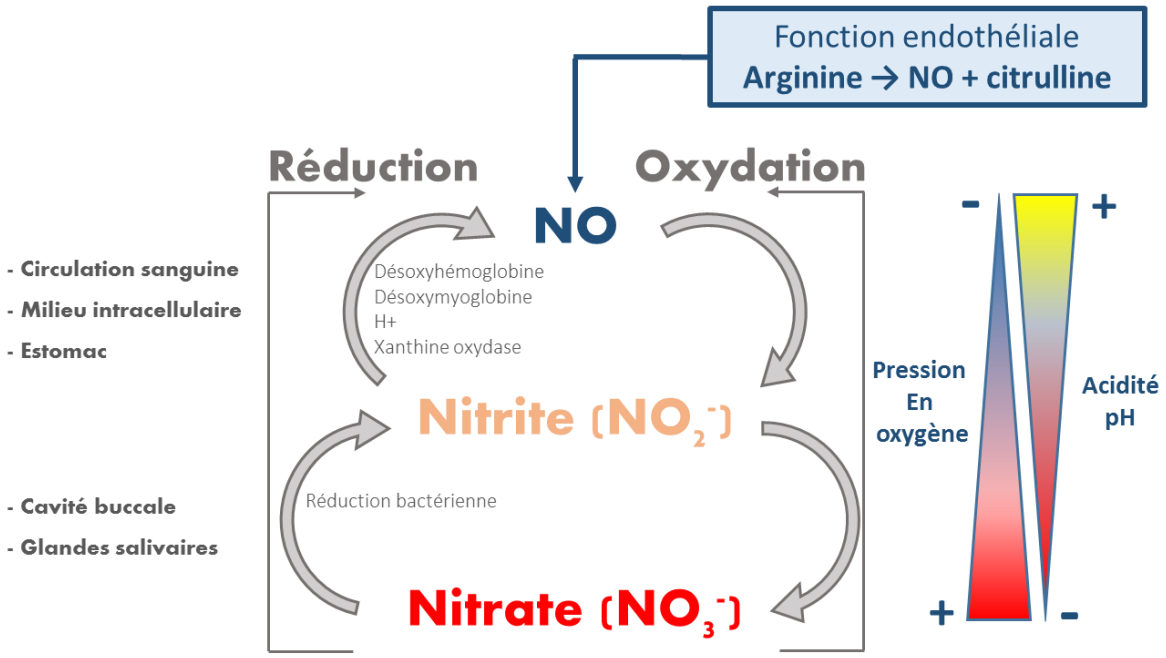


Figure 11. Réaction d'oxydo-réduction du NO

→ Réduction nitrate-nitrite-NO

Le nitrate d'origine alimentaire, une fois consommé, se retrouve dans la cavité buccale (Lundberg and Weitzberg, 2009) (figure 12). Dès la mastication, une fine partie du nitrate salivaire est réduit en nitrite par l'action de bactéries sur la langue, lesquelles utilisent le nitrate en tant que dernier accepteur d'électron lors de la respiration, en lieu et place de l'oxygène. Cette première étape de réduction du nitrate est indispensable, puisque l'absence de bactéries, induit une production gastrique de NO négligeable après l'ingestion de nitrate (Hezel and Weitzberg 2015). Les concentrations salivaires de nitrate et de nitrite sont respectivement jusqu'à 20 et 3000 fois supérieures à celles mesurées au niveau plasmatique (Jon O. Lundberg and Govoni 2004a). La salive est ensuite avalée, et rejoint le milieu acide de l'estomac faisant augmenter légèrement la concentration plasmatique en nitrite (Lundberg and Weitzberg, 2010). Le reste du nitrate ingéré qui n'est pas réduit au niveau de la cavité buccale, va alors atteindre les voies digestives supérieures puis le compartiment sanguin. La concentration plasmatique en nitrate devient maximale environ 1 heure après l'ingestion de nitrate (Lundberg and Weitzberg, 2009). Environ 25% de ce nitrate va être transporté vers les glandes salivaires par un transporteur plasmatique, la sialine (Qin et al., 2012), alors que le reste sera excrété par les urines (Wagner et al., 1983). Seulement 20% de ce nitrate transporté aux glandes

salivaires sera réduit en nitrite sur la surface dorsale de la langue (Duncan et al., 1995), et sera ré-avalé dans l'estomac. La présence d'un milieu acide et d'agents réducteurs tels que la vitamine C, les polyphénols, issus de l'alimentation, favorisent la production gastrique de NO par réduction de l'ion nitrite (Benjamin et al. 1994; Lundberg and Weitzberg, 2009). Ce nitrite transite ensuite vers le compartiment sanguin et atteint un pic de concentration entre 2 et 3 heures après l'ingestion. Il est rapidement distribué au niveau des tissus où il subit une réduction par réaction catalysée par différents complexes comme la désoxyhémoglobine, la désoxymyoglobine, la xanthine oxydase, ou la mitochondrie pour donner du NO. Cette réduction du nitrite semble conditionnée d'un milieu pauvre en oxygène (Castello et al. 2006) et d'un pH élevé (Modin et al., 2001) (cf ci-dessus).

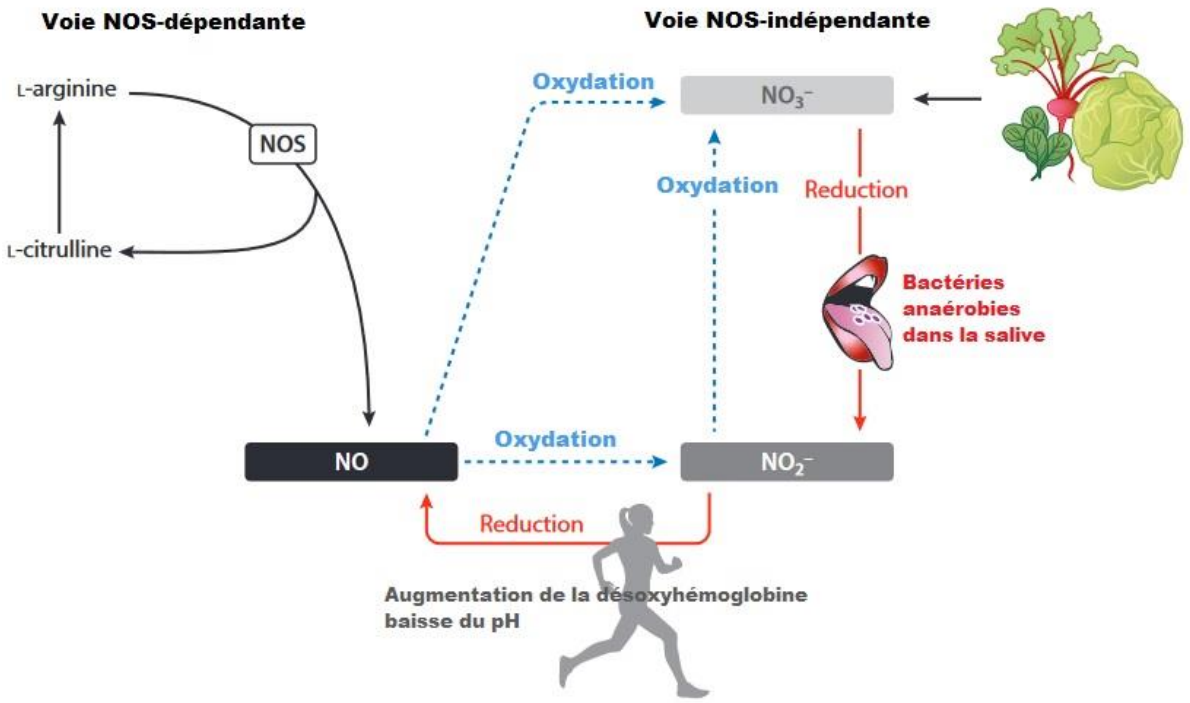


Figure 12. Voie NOS-indépendante (A. M. Jones et al. 2018)

La supplémentation en nitrate

De nombreux travaux se sont intéressés aux effets de la prise de nitrate, sous différentes formes, sur la biodisponibilité en NO, et sur les effets associés sur la santé et la performance à l'exercice. Le travail de synthèse de Siervo et al. (Siervo et al. 2013a) soulignent les résultats de plusieurs études incontestablement positifs de la supplémentation en nitrate dans l'alimentation, pour la prévention des risques

cardiovasculaires essentiellement par une diminution de la PA. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Kapil et al. qui montrent en plus de la baisse de la PA, une diminution de la rigidité artérielle et une diminution de la réactivité plaquettaire, limitant l'agrégation de celles-ci dans le plasma circulant (Vikas Kapil et al. 2010a; V. Kapil et al. 2014). Ces effets se retrouvent tous chez des sujets masculins en bonne santé après une supplémentation d'environ 500 mg de nitrate, que ce soit en aigu ou en chronique. Des études similaires ont aussi démontré une baisse de la PA importante de 11,2 / 9,6 mmHg, après ingestion de 205 mg de nitrate chez des sujets hypertendus. Ce qui suggère que même à des doses plus faibles, les effets peuvent être importants chez des sujets atteints de pathologies cardiovasculaires.

La supplémentation en nitrate semble avoir d'autres effets bénéfiques, notamment sur les performances en endurance. Certaines études ont ainsi montré un lien entre prise de nitrates, sous forme de jus de betterave concentré, et performance à l'effort, avec une diminution du coût énergétique pendant un effort sous maximal (diminution de VO_2 sous maximale), et une augmentation du temps d'endurance chez des sujets sédentaires masculins (A. M. Jones et al. 2018). Ces résultats sont retrouvés sur des efforts de longue durée (Kelly et al., 2013) comme sur des efforts intermittents (Wylie et al., 2013). De façon contradictoire, dans certains cas, l'ingestion de nitrate n'induit aucune modification de la performance à l'effort de longue durée sur cycloergomètre (Bescos et al., 2012; Peacock et al., 2012). Les différences interindividuelles de réponse à la supplémentation en nitrate pourraient être expliquées par la capacité à métaboliser le nitrate ingéré en nitrite puis en NO, notamment par une diminution des bactéries anaérobies dans la cavité buccale responsables d'une grande partie de ces transformations (Doel et al., 2005). Malgré ces résultats contradictoires, la supplémentation en nitrate semblerait donc avoir un effet sur la performance à l'exercice, à la fois sur le coût énergétique et sur les performances maximales.

Quelle source de nitrate ?

Nous venons de voir que la synthèse de NO par la voie NOS-indépendante était conditionnée par la concentration plasmatique de nitrite, elle-même dépendante de la consommation de nitrate par l'alimentation. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées aux différentes interventions nutritionnelles capables d'apporter une quantité suffisante de nitrate : consommation de légumes riches en nitrate,

consommation de jus de betterave concentré en nitrate et ingestion de nitrate de sodium (Jonvik et al., 2016; Clifford et al., 2017; Flueck et al., 2016).

Van Velzen et al. (2008) ont mis évidence que les cinétiques de concentration plasmatique de nitrate étaient dépendantes de la source considérée et se différenciaient autant par la concentration maximale que par le délai d'atteinte de celle-ci. Cependant ces différences étaient faibles, et ne se répercutaient pas sur la concentration plasmatique en nitrite. L'augmentation des concentrations en nitrate et nitrite est similaire après l'ingestion d'une même dose de nitrate apportée de différentes manières : jus de betterave concentré, jus d'épinard, jus de salade, et de nitrate de sodium (Jonvik et al., 2016). Ces résultats montrent que la dose de nitrate absolue ingérée est le facteur prépondérant à prendre en considération. Cependant, il serait intéressant d'envisager l'effet des différentes sources de nitrate en fonction des conditions et de la population étudiée. En effet, dans le cas d'une supplémentation à but ergogénique avant l'effort, il semble pertinent de limiter la prise d'une quantité importante d'aliments pour éviter les dérangements gastriques, donc les formes concentrées s'avèrent plus intéressantes. De la même manière, dans le cas d'une supplémentation à but thérapeutique, il parait important de prendre en compte l'effet du sodium sur l'équilibre hydroélectrique (Gijsbers et al. 2015; Wang et al. 2018), alors que l'apport par une consommation de légumes riches en nitrate peut apporter la dose souhaitée et apporter les bénéfices de la consommation de légumes (micronutriment et antioxydants essentiels)(Van der Avoort et al. 2018).

Quelle dose et quelle durée de supplémentation ?

→ Consommation quotidienne

La question de la quantité de nitrate à ingérer a été longtemps au cœur des débats du fait des risques que cela pourrait avoir sur la santé, et notamment une augmentation de la concentration en méthémoglobinémie. Une directive européenne déjà ancienne (Directive européenne 91/676/CEE, 12 décembre 1991) considère une quantité maximale de nitrate de 50 mg/L dans l'eau pour l'identifier comme potable. Cette dose parait cependant relativement faible en comparaison à celle que l'on peut facilement ingérer en suivant les conseils de l'office mondial de la santé. En effet, la consommation de 4 à 5 fruits et légumes par jour peut apporter une dose de nitrate allant de 175 à 1200 mg/jour (Hord, Tang, and Bryan, 2009). L'évaluation de la consommation de nitrate dans

la population a montré une prise de nitrate de 31–185 mg/jour (~0.5–3.0 mmol) dans les pays européens (Gangolli et al., 1994), de 40–100 mg/jour (~0.6–1.6 mmol) aux Etats-Unis (Mensinga, Speijers, and Meulenbelt 2003). Ceci est cohérent avec une troisième études réalisée aux Pays-Bas chiffrant la consommation à 99 mg/jour (van Loon et al. 1998). Cette consommation a également été évaluée chez l'athlète haut niveau à des niveaux similaires, 106 mg/jour en moyenne, avec des doses allant de 19 à 525 mg.

→ Les compléments alimentaires : quelle concentration ?

Si nous nous intéressons aux différents produits de nutrition sportive, présents sur le marché du complément alimentaire, la dose moyenne apportée par une prise conseillée est de 300 à 500 mg de nitrate, le plus souvent sous forme d'extrait de légumes riches en nitrate. Les études de pharmacodynamique de l'ion nitrate sont relativement robustes et montrent un pic plasmatique de nitrate apparaissant après 1 à 2 heures, bien avant le pic de nitrite plasmatique observé, lui, environ 3h après. Ces quantités restent plus élevées durant les 24 heures suivant l'ingestion. Les études ont montré qu'une dose comprise entre 300 et 600 mg (4.8 – 9.7 mmol) de nitrate était suffisante pour observer des effets bénéfiques sur la disponibilité en NO ainsi que sur la santé et la performance (Bryan and Ivy 2015; Hoon et al. 2013; Wylie et al. 2013). Wylie et al. (2013) ont comparé l'effet 4,2, 8,4 et 16,8 mmol de nitrate sur la performance sportive. Ils ont mis en évidence une relation dose dépendante entre le nitrate ingéré et les cinétiques plasmatiques de nitrate et de nitrite. Pour autant, les effets ergogéniques sur la performance étaient identiques entre la dose de 8,4 et 16,8 mmol, et n'apparaissaient pas pour une dose de 4,2 mmol. Ceci renforce les résultats observés par Hoon et al. (2013), montrant que la performance à l'effort était améliorée après la prise de 8,4 mmol de nitrate, mais qu'une dose 4,2 mmol n'avait aucun effet. Pris dans leur ensemble, ces résultats observés sur la population générale et l'effet ergogénique et thérapeutique du nitrate, il semble qu'une dose comprise entre <u>300 et 600 mg</u> (4,8 – 9,7 mmol) suffit pour augmenter la dose moyenne ingérée quotidiennement, et faire augmenter de façon significative les concentrations plasmatiques en nitrate et nitrite.

→ Durée de la supplémentation

Les effets observés sur la santé ne semblent pas être dépendants de la durée de supplémentation (Stanaway et al., 2017; Ashworth and Bescos, 2017). En effet, dès la première dose, la concentration en nitrate et nitrite plasmatique augmente, mais ne

semble pas ou peu influencée par la répétition des prises. Au regard de l'effet sur l'exercice, l'effet de la supplémentation observé après une prise aigüe de nitrate sur le coût énergétique à l'exercice est également présent 15 et 28 jours après une dose quotidienne de 5.2 (Vanhatalo et al., 2010) et 6 mmol de nitrate (Wylie, Ortiz de Zevallos, et al. 2016). L'effet observé après ces 15 et 28 jours de supplémentation n'était pas différent de celui observé en prise aigüe, ce qui suggère un faible impact de la durée de supplémentation sur la biodisponibilité en NO. Cependant, d'autres études ont montré un effet de la durée de la supplémentation sur la performance maximale et la tolérance à l'effort (Vanhatalo et al., 2010). L'effet d'une supplémentation chronique (Cermak, Gibala, and van Loon, 2012) sur la performance à l'effort semble plus robuste que celui d'une prise aigüe à dose équivalente (Lansley et al., 2011; Coggan et al., 2015).

Nous venons de voir que la supplémentation en précurseur de NO pouvait augmenter la biodisponiblité en NO. La voie NOS-dépendante peut être supplémentée par un apport de L-arginine en tant que substrats de la NOS et ainsi augmenter son potentiel d'activité. La voie NOS-indépendante peut être supplémentée par apport de nitrate dans l'alimentation et ainsi augmenter le réservoir de nitrite en tant que substrat à la réaction de réduction produisant du NO. Cependant, malgré une littérature scientifique riche, les effets sur l'augmentation de la biodisponibilité en NO, et par conséquent sur la santé et la performance sportive, restent très controversés du fait notamment de différences méthodologiques significatives. Il semble en effet que les effets de ce type de stratégies nutritionnelles soient dépendants de la durée de la supplémentation, de la dose ingérée, de la population étudiée, et de l'exercice ou de la pathologie considérée.

A retenir sur le chapitre « La biodisponibilité en NO »

☺ La voie de synthèse de NO « NOS-dépendante » peut être supplémentée par augmentation de la L-arginine plasmatique.

→ Soit par l'ingestion de 5 à 9 g de L-arginine,

→ Soit par l'ingestion de 3 à 10 g de L-citrulline.

☺ La voie de synthèse de NO « NOS-indépendante » peut être supplémentée par augmentation des nitrates et nitrites plasmatiques, par l'ingestion de 300 à 600 mg (4,8 – 9,7 mmol) de nitrate (légumes riches en nitrate, jus de légumes concentrés en nitrate, ingestion de nitrate de sodium).

☺ La supplémentation en précurseurs du NO semble avoir un effet sur la santé et sur la performance à l'exercice.

☺ Ces effets semblent dépendre de plusieurs facteurs :

- le sujet (âge, niveau d'activité physique…),
- La méthodologie (durée de supplémentation, dose…),
- une éventuelle pathologie ou dysfonction vasculaire sous-jacente
- le type d'exercice ou les conditions (altitude, etc) étudiées.

➔ L'intérêt ergogénique et thérapeutique des précurseurs de NO demande encore à être précisé.

Les effets des précurseurs de NO

Les précurseurs de NO regroupent toutes les molécules ingérées par voie orale pouvant augmenter les capacités de l'organisme à synthétiser du NO. Les résultats obtenus par les différentes études montrent que leurs effets sur l'augmentation de la biodisponibilité en NO peuvent être influencés par différents facteurs que nous allons détailler dans ce chapitre. L'objectif est d'identifier ces facteurs de façon à comprendre leur intérêt thérapeutique (en prévention ou en curatif) et ergogénique réels.

Les différents types de populations

Lorsque l'on considère l'ensemble des études disponibles dans la littérature, la population étudiée et le degré de dysfonction endothéliale apparait être un facteur majeur de réponse aux précurseurs de NO.

Influence de l'âge

La fonction enzymatique des NOS diminue au-delà de 60 ans (Taddei et al., 2001; Sindler et al., 2011) par baisse de la disponibilité en substrat (L-arginine) et cofacteur (oxygène, BH4), et/ou une diminution de l'activité enzymatique. La diminution de la synthèse de NO induite, s'accompagne d'une augmentation de la rigidité artérielle et de la PA de repos (McEniery et al., 2005; Mitchell, 2007; Mitchell et al., 2004). La biodisponibilité en NO est également plus faible pendant l'effort chez le sujet âgé sain, et pourrait expliquer une élévation plus importante des valeurs de PA à l'exercice (Stratton et al., 1994) par augmentation des résistances vasculaires (Milia et al., 2015). Ceci suggère une association entre biodisponibilité en NO et diminution de la tolérance à l'effort associée à l'âge (Lauer et al., 2008; Adachi et al., 1997). Ces résultats suggèrent l'intérêt d'une supplémentation en précurseurs de NO chez le sujet âgé, que ce soit dans la prévention des maladies cardiovasculaires, l'amélioration de la tolérance ou de la performance à l'exercice.

La supplémentation en précurseurs de NO diminue la PA et améliore la rigidité artérielle, quel que soit l'âge (Kelly et al. 2013; Jajja et al. 2014; Siervo et al. 2013a). Cet effet a été décrit après l'ingestion de nitrate mais reste nuancé après la supplémentation en L-arginine ou L-citrulline (Mirenayat et al., 2018). Une étude a comparé la réponse hyperémique post-occlusive lors d'un test d'ischémie reperfusion (FMD), marqueur de la

fonction endothéliale, chez des sujets jeunes et des sujets âgés, soit sédentaires, soit entrainés (Black et al., 2009). Dans cette étude, le pourcentage de FMD était identique entre les sujets jeunes et âgés entrainés alors qu'il était plus faible chez les sujets âgés sédentaires, suggérant que la dysfonction endothéliale liée à l'âge était réversible par l'activité physique. Les effets d'une supplémentation en précurseurs de NO sur la tolérance à l'exercice chez le sujet âgé restent controversés. Alors qu'il a été mis en évidence une diminution de la cinétique de VO_2 lors d'un exercice de marche sur tapis (Kelly et al., 2013), aucun effet n'a été mis en évidence sur le pic de VO_2 lors d'un test sur vélo (Siervo et al., 2016) ou lors d'un test de marche de 6 minutes (Kelly et al., 2013). Tous ces résultats suggèrent que l'effet des précurseurs de NO semble davantage lié à la qualité de la fonction vasculaire initiale qu'à l'âge lui-même.

Influence du type de pathologie

La relation entre dysfonction endothéliale et maladie cardiovasculaire chronique questionne logiquement l'intérêt d'une supplémentation en précurseurs de NO chez le patient. De nombreuses études se sont intéressées aux effets aigus et chroniques de précurseurs sur des marqueurs cliniques de la fonction cardiovasculaire, en particulier la PA et la tolérance à l'effort.

Ainsi, la supplémentation, soit de la voie NOS-dépendante, soit de la voie NOS-indépendante, montre une diminution cliniquement significative de la pression artérielle systolique (PAS) et diastolique (PAD) (A. J. Webb, Patel, et al. 2008a; Allerton et al. 2018; Ghosh et al. 2013). Chez l'hypertendu, Kapil et al. (2015) ont montré une baisse des pressions artérielles systolique et diastolique de repos respectivement de 8 et 2,5 mmHg aprés supplémentation chronique de 380 mg de nitrate par jour, confirmée en mesure ambulatoire sur 24 h (moins 8 et 5 mmHg pour les PAS et PAD) et en auto-mesures (- 8 et 4 mmHg pour les PAS et PAD). Ces données renforcent celles obtenues chez le patient obèse hypertendu montrant que la prise quotidienne de 6 g de L-citrulline diminuaient la PAS de 15 ± 3 mmHg (Figueroa et al., 2012).

La tolérance à l'effort chez le patient est également sensible à la supplémentation en précurseur de NO (Woessner et al. 2018; Sami A. Omar, Artime, and Webb 2012). La supplémentation en nitrate améliore la tolérance à l'effort par diminution des douleurs liées aux problèmes vasculaires (Kenjale et al., 2011), par maintien de la fraction d'éjection ventriculaire (Eggebeen et al., 2016), et par diminution des résistances

vasculaires chez le patient atteint de bronchopneumopathie chronique obstructive (Berry et al., 2015). Cependant ces résultats diffèrent de ceux obtenus chez le patient diabétique de type II (Shepherd, Gilchrist, et al. 2015), ou une nouvelle fois chez le patient atteint de bronchopneumopathie chronique obstructive (Shepherd, Wilkerson, et al. 2015) ne montrant aucun effet de la supplémentation sur le VO_2 à l'exercice sous-maximal.

Les précurseurs de NO ont également des effets sur d'autres marqueurs cliniques de la fonction cardiovasculaire, comme la fonction endothéliale par augmentation du pourcentage de FMD (Rodriguez-Mateos et al., 2015; Lara et al., 2016), une réduction de l'agrégation plaquettaire (G. Richardson et al. 2002) ou une diminution de la PA pulmonaire (C. J. Hunter et al. 2004). Cependant, plusieurs travaux de synthèse sur la supplémentation en précurseurs montrent également l'absence d'effet thérapeutique après ingestion de nitrate ou de L-citrulline (S. A. Omar et al. 2016; Allerton et al. 2018).

Les effets thérapeutiques des précurseurs de NO restent donc contrastés. Si l'effet sur la tolérance à l'effort reste discuté, l'effet sur la PA semble plus robuste, surtout chez l'hypertendu. La variabilité des réponses semble dépendre en partie des mécanismes de la dysfonction endothéliale. Par exemple, une dysfonction endothéliale induite par une concentration trop importante d'ADMA, ne semble pas être sensible à une prise de L-citrulline (Cooke 2000). De la même manière, l'effet d'un précurseur de NO pourrait être diminué par un stress oxydant chronique. Le NO une fois synthétisé, peut réagir avec l'ion superoxyde, un radical libre ayant une demie vie relativement importante, physiologiquement neutralisé par la superoxyde dismutase. Dans le cas d'un excès d'ion superoxyde, sa réaction avec le NO peut entrainer l'inhibition de la NOS et la diminution de la biodisponibilité en NO. D'une part, la réaction entre les deux radicaux libres entraine la formation de peroxynitrites, un radical libre inhibant la réaction de synthèse de NO par les NOS, d'autre part, la radicalisation du NO par l'ion superoxyde fait diminuer la biodisponibilté en NO (Förstermann, Xia, and Li 2017).

Influence du sexe

A notre connaissance, aucune étude n'a étudié l'effet du sexe sur la réponse à la supplémentation en précurseurs de NO au repos ou à l'exercice. Cependant, il existe des différences sur la fonction vasculaire entre les hommes et les femmes notamment du fait de modifications hormonales (Levenson et al., 2001; Jensen-Urstad and Johansson, 2001; Celermajer et al., 1994; Parker et al., 2006; Black et al., 2009). Dans une population âgée

de moins de 50 ans, le pourcentage de FMD est plus important chez la femme (Levenson et al., 2001). En accord avec ces résultats, Celermajer et al., (1994) ont montré que la fonction endothéliale s'altère dès 40 ans chez l'homme et 50 ans chez la femme. Cette différence s'inverse après 50 ans, et l'altération de la fonction endothéliale devient plus importante chez la femme que chez l'homme (Jensen-Urstad et al., 2001), probablement en lien avec la ménopause et les modifications de sécrétion ovarienne d'œstrogènes (Magness and Rosenfeld 1989; Gangar et al., 1991). Le sexe pourrait donc potentiellement influencer la réponse aux précurseurs de NO. Chez la femme en période d'activité génitale, il faut prendre en compte les cycles hormonaux et dans tous les cas, la prise de traitements hormonaux doit être considérée pour limiter la variabilité de mesure et ne pas biaiser l'interprétation.

Influence du niveau d'entrainement et de la typologie musculaire

L'effet de la supplémentation en NO, autant sur la santé que sur la performance à l'exercice, semble dépendant du niveau d'activité physique et du niveau d'entrainement. Ainsi, les effets sont plus marqués chez les sujets actifs mais non sportifs que chez les sujets entrainés (A. M. Jones et al. 2018). Plusieurs études ont montré l'absence d'effet d'une supplémentation aigüe ou chronique en précurseurs de NO sur le coût énergétique et la performance maximale à l'effort, que ce soit sur ergocycle (Hoon et al., 2014; MacLeod et al., 2015; Nyakayiru et al., 2017) ou en course à pied (Boorsma, Whitfield, and Spriet, 2014; Lane et al., 2014,Porcelli et al., 2015; Boorsma, Whitfield, and Spriet, 2014). L'absence d'effets est principalement observée dans des populations de sujets entraînés en endurance présentant un VO_2max compris entre 60 et 80 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ (Peacock et al., 2012; Christensen, Nyberg, and Bangsbo, 2013). Une revue récente a montré que l'aptitude aérobie influence l'effet ergogénique de la supplémentation en précurseurs de NO dans une population d'individus allant du sédentaire aux plus entrainés (VO_2max de 28,2 à 81,7 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) (Porcelli et al., 2015). Après supplémentation, les sujets les plus entrainés présentent des pics plasmatiques de nitrate et nitrite plus faibles comparées aux sujets moyennement entrainés (Porcelli et al., 2015). Le cout énergétique à l'exercice est également diminué par une supplémentation en précurseur de NO plus spécifiquement chez les sportifs les moins entrainés (VO_2max 45 *versus* 60 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$ pour les plus entrainés) (Carriker et al., 2016).

Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer cet effet entrainement sur les réponses aux précurseurs de NO.

Une première hypothèse est que l'athlète entrainé pourrait avoir besoin d'une dose plus importante de précurseurs de NO que l'athlète moins entrainé. Boorsma et al. (2014) ont évalué chez l'athlète (VO_2max de 80 ± 5 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) l'effet de 19,5 mmol de nitrate *vs placebo*, sur la performance. Cette forte dose (> 2 fois la dose habituelle) n'a pas montré d'effet significatif sur le temps de parcours sur une distance donnée, suggérant que la dose n'expliquerait probablement pas le peu d'effet ergogénique retrouvé chez l'athlète entrainé.

Une autre explication serait liée au fait que les athlètes ont des niveaux plasmatiques de nitrate et nitrite au repos supérieurs à ceux mesurés chez les sujets sédentaires (Totzeck et al., 2012). Les adaptations liées à l'entraînement en endurance sont nombreuses, et une partie d'entre elles semblent pouvoir expliquer cette synthèse de NO basal supérieure chez l'athlète très entrainé. Un programme d'entraînement chez des sujets sédentaires augmente ainsi l'angiogenèse (Jensen, Bangsbo, and Hellsten, 2004) et la quantité de NOS au niveau musculaire (McConell et al., 2007) permettant une synthèse de NO absolue plus importante.

Enfin, le peu d'effet retrouvé chez l'athlète entrainé pourrait également être expliqué par une moindre réduction du nitrite en NO. En effet l'entrainement en endurance limite ou retarde la survenue d'un environnement musculaire hypoxique et acide. Ce phénomène est accentué par l'augmentation de la proportion des fibres de type I au dépend des fibres de type II après un programme d'entrainement (Tesch and Karlsson, 1985). La réduction du nitrite en NO étant dépendante de la pression partielle en oxygène et du pH, l'entrainement en endurance pourrait donc limiter les capacités de synthèse de NO par la voie NOS-indépendante. Les résultats positifs sur la performance d'une supplémentation en précurseurs de NO sur des exercices mettant en jeu les membres supérieurs (Muggeridge et al., 2013; Peeling et al., 2015) dont les muscles sont plus riches en fibres de type II (Polgar et al., 1973), viennent conforter cette hypothèse. Ces études ont montré un effet significatif à la fois sur le coût énergétique et sur la performance maximale après respectivement 5 et 8,6 mmol de nitrate, malgré le niveau élevé des athlètes évalués.

Le travail de synthèse de Jones et al. (A. M. Jones et al. 2018) a également pu soulever que lors de certaines études, bien que l'effet moyen ne soit pas significatif, un nombre

important de sportifs avaient une amélioration significative de la performance. La présence de certains sujets dit « répondeurs » semble indiquer des différences interindividuelles de sensibilité à la supplémentation en précurseurs de NO, qui pourrait expliquer une partie de la variabilité de la réponse à l'entrainement.

En résumé, la réponse aux précurseurs de NO dépend du niveau d'entrainement du fait que la fonction endothéliale s'améliorant avec l'entrainement, le déficit en NO est absent ou minime chez les athlètes les plus entrainés.

Influence du niveau d'oxygénation systémique

La synthèse de NO via les NOS requiert la présence de cofacteurs tels que l'oxygène, justifiant l'hypothèse d'un effet plus important des précurseurs de NO dans le cas d'une diminution du contenu artériel en oxygène. Ainsi, une exposition aigüe à l'hypoxie d'altitude (Fraction inspirée en oxygène (FiO_2): 11%) (Katayama et al., 2013; Lewis et al., 2017) ou à une hypoxémie chronique dans le cas d'une dysfonction cardiorespiratoire (Amra et al., 2009; Chung et al., 2010) altèrent la fonction endothéliale.

S'il n'est pas possible de rétablir un niveau d'oxygénation proche de la normale, la supplémentation en précurseurs de NO par la voie NOS-indépendante semble donc avoir un intérêt dans ces conditions. Ainsi la supplémentation en nitrate influence les réponses physiologiques à l'hypoxie, mais ses effets thérapeutiques et ergogéniques réels restent à préciser (tableau 1).

La supplémentation en nitrate restaure la fonction endothéliale causée par une exposition de 6 jours à une hypoxie d'altitude équivalente à 3700 m (Bakker et al., 2015). Cumpstey et al. (2017) durant une exposition de 7 jours à une altitude de 4550 m n'ont montré aucun effet de l'augmentation de la biodisponibilité en NO sur les paramètres cardiorespiratoires et hémodynamiques. L'effet du nitrate a aussi été évalué sur les apnées centrales nocturnes induites par l'altitude (Patrician et al., 2018) sans effet sur la saturation moyenne malgré une augmentation de l'amplitude des variations de saturation causées par les pauses respiratoires.

L'exercice en hypoxie est associé à une réduction de l'oxygénation musculaire et cérébrale ainsi qu'une réduction des capacités oxydatives musculaires participant à l'altération de la performance à l'effort. Une revue récente a mis en évidence des effets positifs d'une supplémentation en nitrate, permettant de restaurer les performances observées en normoxie (A. M. Jones et al. 2018). Cet effet ergogénique semble

principalement expliqué par une optimisation de la resynthèse de phosphocréatine (PCr) induite par une amélioration de la synthèse d'ATP mitochondriale (Vanhatalo et al., 2011). L'absence d'effet d'une même supplémentation sur la resynthèse de PCr en normoxie (Vanhatalo et al., 2014) suggère que les effets en hypoxie seraient dus à un apport supérieur en oxygène plutôt qu'une amélioration du rapport ATP/oxygène de la mitochondrie. La supplémentation en nitrate entraine des modifications de l'oxygénation tissulaire en hypoxie (Masschelein et al., 2012; Shannon et al., 2017). Lors d'un effort en hypoxie, l'ingestion de nitrate augmente l'indice d'oxygénation tissulaire mesuré par spectroscopie proche infrarouge dans les membres inférieurs. Ceci a été mis en évidence à la fois après une prise chronique lors d'un effort incrémental sur ergocycle (Masschelein et al. 2012a) et après une prise aigüe lors d'un effort à haute intensité sur tapis de course (Oliver M. Shannon et al. 2017).

Si les effets de la prise chronique en nitrate sur les réponses à l'exercice en hypoxie sont relativement robustes (Rossetti et al. 2017; Masschelein et al. 2012a; Kelly et al. 2014), l'effet de la prise aigüe semble d'avantage nuancée (Gasier et al., 2017; Nybäck et al., 2017). La réponse semble dépendre du type d'exercice utilisé, et du niveau d'entrainement des sujets évalués avec là encore un effet ergogénique qui diminue avec le niveau d'entrainement des sujets.

Acute or chronic?	Study	Subjects	Nitrate intervention	Hypoxia intervention	Criterion exercise test	Ergogenic?[b]
Acute	Shannon et al. (135)	Trained and untrained	15.2 mmol BR	~15.3% O_2 (2,500 m)	1,500-m treadmill TT	✓
	Gasier et al. (46)	Healthy	15 mmol $NaNO_3$	~12.3% O_2 (4,300 m) hypobaric	T_{lim} for handgrip exercise	×
	Nybäck et al. (111)	Trained skiers	13 mmol BR	~16.8% O_2 (1,800 m)	1000-m roller-skiing TT	×
	Shannon et al. (134)	Healthy	12.5 mmol BR	~14.0% O_2 (3,000 m), ~11.7% O_2 (4,300 m)	3-km treadmill TT with 10-kg load	✓
	Arnold et al. (5)	Trained runners	7 mmol BR	~15.3% O_2 (2,500 m), ~12.7% O_2 (4,000 m)	10-km treadmill TT (2,500m) T_{lim} incremental test (4,000 m)	×
	MacLeod et al. (91)	Trained cyclists	6 mmol BR	~15.3% O_2 (2,500 m)	10-km cycle TT	×
	Muggeridge et al. (106)	Trained cyclists	~5.0 mmol BR	~15.3% O_2 (2,500 m)	16.1-km cycle TT	✓
Chronic	Vanhatalo et al. (152)	Moderately trained	1 day, 9.3 mmol/24 h	~14.5% O_2 (3,000 m)	T_{lim} for single-leg knee extension	✓
	Bourdillon et al. (16)	Trained cyclists	3 days, ~7.4 mmol/day $NaNO_3$	~11.0%O_2 (5,200 m)	15-km cycle TT	×
	Kelly et al. (69)	Physically active	3 days, 8.4 mmol/day BR	~13.1% O_2 (3,700 m)	T_{lim} at 75%Δ cycle	✓
	Masschelein et al. (95)	Healthy	6 days ~5.1 mmol/day BR	~11.0% O_2 (5,200 m)	T_{lim} incremental test cycle	✓
	Rossetti et al. (130)	Recreationally active	6 days, 6.4 mmol/day BR	~14.1% O_2 (3,100m)	T_{lim} at 80% hypoxic $\dot{V}_{O_2\,max}$ reserve with 15-kg load, treadmill	×

Tableau 1. Effet de la supplémentation en précurseur de monoxyde d'azote sur la performance en condition hypoxique(A. M. Jones et al. 2018).

Influence des différents types d'exercices

La supplémentation en précurseurs de NO augmente la performance, en prise aigüe ou chronique, et sur des efforts d'endurance incrémentaux et à intensité constante ou des efforts à haute intensité. Différents mécanismes sont proposés (figure 13):

- Amélioration de l'apport d'oxygène vers les tissus par vasodilatation périphérique. Cet apport augmenté devient intéressant dans la situation où l'oxygène est limitant.

- Réduction de la synthèse d'ATP à partir de l'hydrolyse de la PCr et de la phosphorylation oxydative pendant l'effort. Ceci permet de retarder l'accumulation des métabolites tels que l'adénosine diphosphate et le Phosphate

inorganique et la déplétion de PCr, limitant ainsi le dysfonctionnement du complexe acto-myosine.

- Limitation du découplage mitochondriale et donc une réduction des fuites de protons vers la matrice. Ces modifications entrainent une augmentation du rapport ATP/oxygène, autrement dit une baisse du coût énergétique de la production d'ATP.

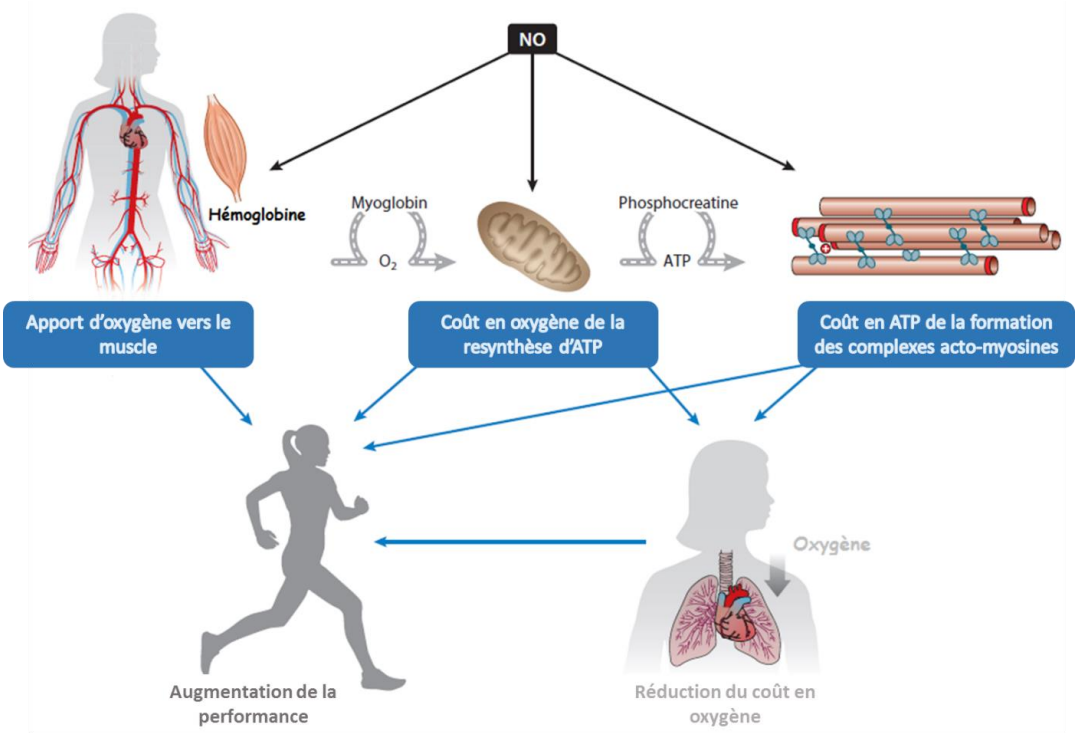


Figure 13. Les mécanismes de l'augmentation de la performance par le NO (adapté de Jones et al. 2018)

Plusieurs travaux de synthèse ont analysé l'effet de la supplémentation en précurseurs de NO sur la performance au sens large. Au regard des différents mécanismes impliqués dans l'exercice physique pouvant être impactés par le NO, il semble que l'effet ergogénique puisse être plus ou moins marqué en fonction du type d'exercice réalisé. Ces différents exercices peuvent être distingués par leur durée, qui elle-même est dépendante de l'intensité. Ainsi, nous pouvons séparer les efforts explosifs et les efforts de haute intensité des efforts de longue durée.

1°) Effet du NO sur la performance à l'effort de longue durée

Les performances à l'effort de longue durée peuvent être évaluées de deux manières différentes. La première est une distance à parcourir le plus vite possible, qualifiée d'effort

de contre-la-montre. Le deuxième est un effort à tenir le plus longtemps possible qualifié d'effort d'endurance.

Les efforts de contre-la-montre

Les efforts de contre-la-montre sont des essais chronométrés pour parcourir une distance donnée. La performance durant un tel effort est dépendante de la force de contraction qui peut être produite par la quantité d'oxygène consommée. Autrement dit, la performance sera améliorée si pour une même quantité d'oxygène consommée, la force de contraction est plus importante. Une revue de la littérature récente s'est intéressée aux effets de la supplémentation en nitrate sur ces efforts de contre-la-montre (A. M. Jones et al. 2018). Le graphique présenté en figure 14 montre des résultats présents notamment chez le sujet moyennement entrainé. Ces effets ont été observés autant sur des exercices de course à pied, de pédalage ou de rameurs pour des durées allant jusqu'à une heure. En considérant l'ensemble des études, nous observons une augmentation de la performance de 1 à 3% par rapport au groupe placebo. La supplémentation chronique en L-citrulline augmente également la performance lors d'efforts de contre-la-montre (Figueroa et al., 2017). Suzuki et al. (2016) ont démontré qu'une supplémentation chronique de 2,4 g de L-citrulline par jour diminuait de 1,5% le temps mis pour parcourir 4 km sur ergocycle. Tous ces résultats montrent donc que l'augmentation de la biodisponibilité en NO peut influencer la performance lors d'un effort de contre-la-montre. Le NO a un effet sur le fonctionnement mitochondrial, augmentant le rapport ATP/oxygène et diminuant ainsi le coût en oxygène pour une même production de force. Cette réduction du coût énergétique, semble pouvoir être le mécanisme explicatif de l'effet sur ce type d'effort.

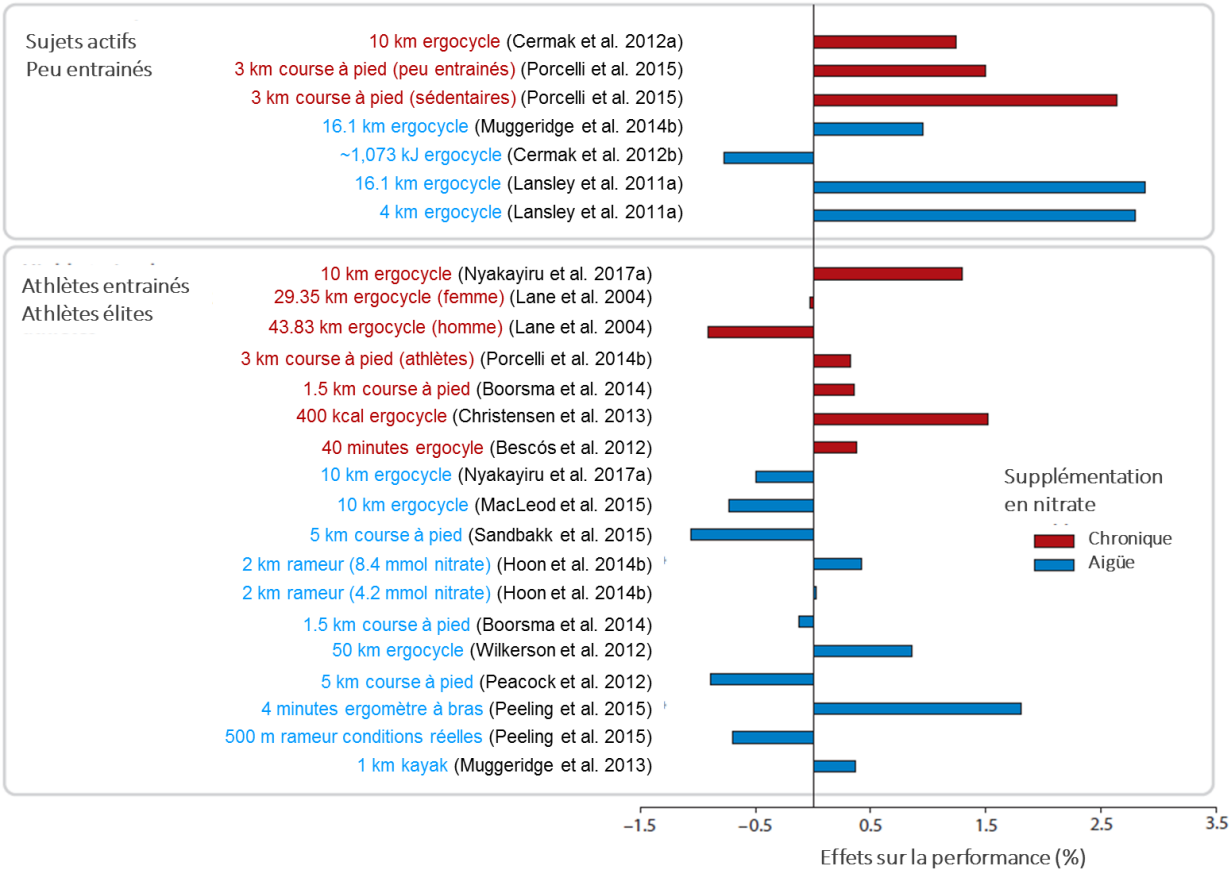


Figure 14. Méta-analyse sur les effets ergogéniques du NO durant un effort de contre-la-montre (adapté de Jones et al. 2018).

Les efforts d'endurance

Les exercices de longue durée de type endurance sont des exercices sous-maximaux poursuivis jusqu'à épuisement de l'athlète. Il peut y avoir des efforts rectangulaires, à intensité constante, et des efforts triangulaires (incrémentaux/maximaux) à intensité progressive. Autrement dit, la performance sera améliorée si la fatigue est diminuée permettant de retarder l'épuisement et ainsi d'augmenter le temps d'endurance mesuré. Une méta-analyse (figure 15) récente a évalué l'effet du nitrate sur la performance lors de tests à intensité constante ou à intensité progressive (McMahon, Leveritt, and Pavey, 2017). La supplémentation chronique en nitrate semble pouvoir améliorer la performance sur ergocycle (Bailey et al., 2009; Larsen et al., 2010). La supplémentation en nitrate augmente également la résistance à l'effort lors d'un exercice d'extension du quadriceps par réduction de la VO_2 sous maximale et la limitation de la déplétion en PCr (Bailey et al., 2010). Une autre revue récente a également mis en évidence un effet d'une supplémentation chronique en L-citrulline sur la performance lors d'effort de contre-la-montre (Figueroa et al., 2017). Alors que l'ingestion de 6 g de L-citrulline par jour pendant

7 jours augmente le temps d'endurance sur ergocycle lors d'un effort constant de haute intensité (Bailey et al., 2015), la consommation de pastèque concentré en L-citrulline (3,4 g par jour) n'a aucun effet (Bailey et al., 2016).

L'augmentation de la biodisponibilité en NO semble donc avoir un effet ergogénique, à la fois sur les exercices d'endurance rectangulaires et triangulaires. Le NO diminue la consommation d'oxygène à l'exercice sous-maximal, en diminuant soit le rapport ATP/O_2, soit le coût en ATP de la contraction musculaire, limitant ainsi l'accumulation de métabolites issus de l'hydrolyse de l'ATP et la déplétion des stocks de PCr. Cette limitation des perturbations métaboliques musculaires pourrait expliquer l'augmentation de la résistance à l'effort lors d'exercices à intensité constante ou progressive (Allen, Lamb, and Westerblad, 2008).

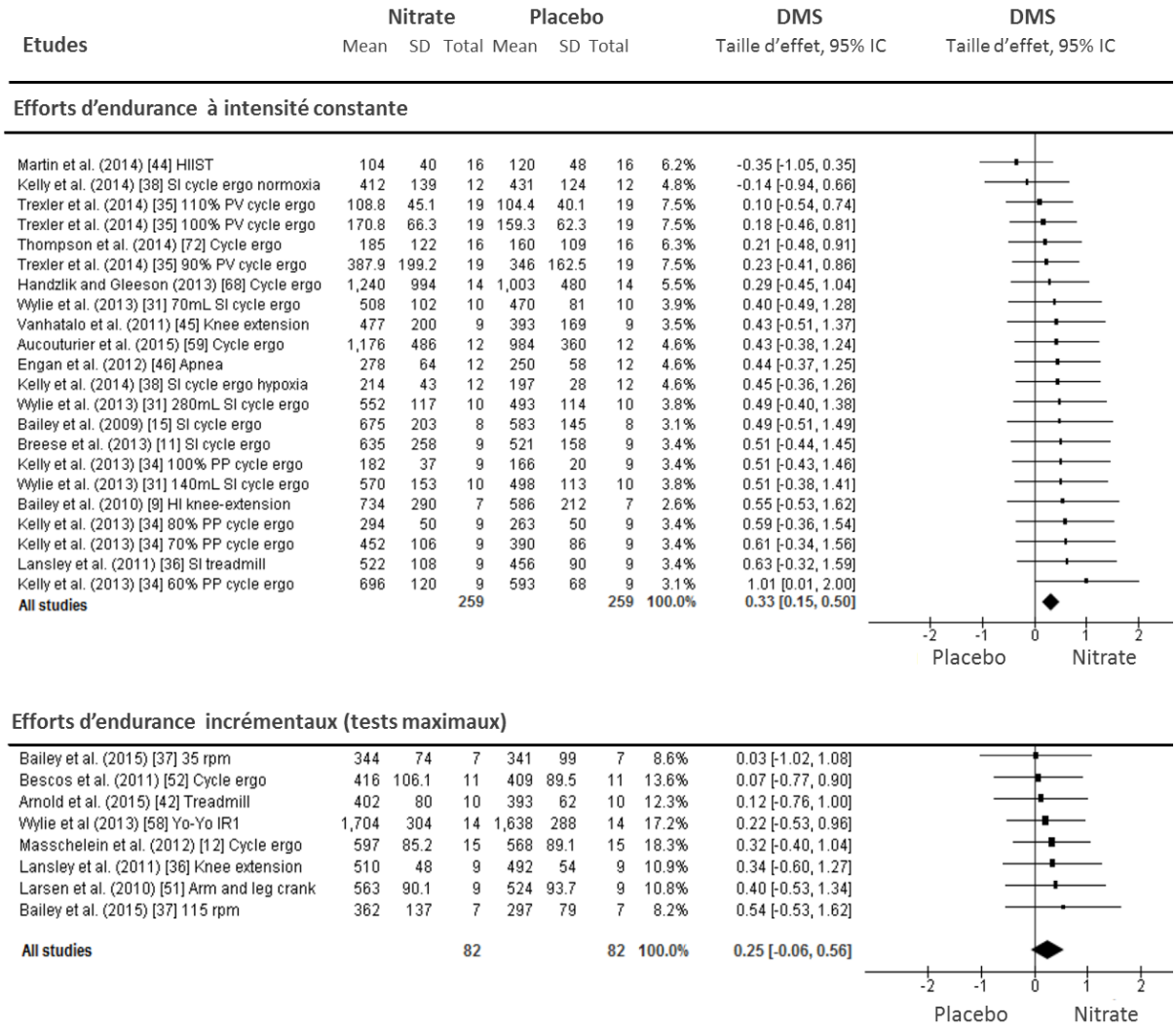


Figure 15. Effet des précurseurs de NO sur la performance en endurance lors d'exercices à intensité constante ou progressive (McMahon, Leveritt, and Pavey 2017)

2°) Effet du NO sur la performance lors d'efforts supra-maximaux

En 2013, Ferguson et al. ont montré une influence du type de fibre musculaire sur les effets des précurseurs de NO. La prise aigüe de nitrate augmentait la perfusion musculaire à l'effort, mais cette augmentation était corrélée positivement avec la proportion de fibre de type II. Ceci serait expliqué par la diminution plus importante du pH et l'apport moindre d'oxygène dans les fibres de type II comparé aux fibres de type I, diminuant ainsi la réduction du nitrite en NO (McDonough et al., 2005). Ce constat semble indiquer un intérêt de la supplémentation dans les efforts sollicitant les fibres rapides, comme les efforts explosifs à très haute intensité, les efforts intermittents à haute intensité ou les répétitions de sprint.

Plusieurs études ont montré une amélioration de la performance lors d'exercices intermittents à haute intensité après une supplémentation en nitrate ((Wylie, Bailey, et al. 2016; Aucouturier et al. 2015; Thompson et al. 2015). Wylie et al. (2016) ont montré qu'une supplémentation importante (29 mmol en 36 h) en nitrate augmentait de 4,2% la distance parcourue lors d'un test intermittent intense. Cet effet a été également été retrouvé (augmentation de 3,9%) avec une dose plus faible, similaire à celle utilisée pour les efforts d'endurance (Thompson et al., 2016). Une supplémentation de 3 jours en nitrate augmente la performance au cours d'un exercice intermittent supra-maximal composé d'une période active de 15 s à très haute intensité et d'une récupération passive de 30 s (Aucouturier et al., 2015). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par deux autres études sur la performance lors d'une répétition de sprint de 6 secondes pendant 12 (Wylie, Bailey, et al. 2016) et 80 minutes (Thompson et al., 2015). Ceci est cependant contredit par des résultats ne montrant aucun effet ergogénique sur des exercices de ce type, que ce soit en prise chronique ou aigüe avec des doses similaires. En effet, selon d'autres auteurs, la supplémentation en nitrate n'augmentait pas la résistance sur des efforts intermittents, autant chez les athlètes de sports collectifs (Martin et al., 2014), que chez le cycliste entraîné (VO_2max: ≈ 72 $mL.min^{-1}.kg^{-1}$) (Christensen, Nyberg, and Bangsbo, 2013). L'absence d'effet ergogénique se retrouve aussi après la prise de L-arginine, ne montrant aucune amélioration de la capacité à répéter des efforts à très haute intensité (Liu et al., 2009).

Chez l'animal, il a été montré qu'une supplémentation en nitrate de sodium augmentait la production de force par augmentation du calcium libre intracellulaire, induit par une optimisation de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique (Hernández et

al., 2012). Cette augmentation de la production de force pourrait en partie expliquer l'augmentation de performance lors d'efforts supra-maximaux. Cependant, ceci n'a pas pu être mis en évidence chez l'homme. Le NO pourrait avoir également un effet pendant les phases de récupération. La capacité à répéter des sprints est en partie dépendante de la capacité de resynthèse de PCr pendant les phases à basse intensité, conditionnant la part d'ATP synthétisée par le métabolisme des phosphates lors des phases d'exercice. La resynthèse de la PCr est déterminée par la capacité maximale de la phosphorylation oxydative, et dépend de la disponibilité en oxygène. Vanhatalo et al. (2014) ont montré que la supplémentation en nitrate augmentait la resynthèse de PCr pendant la récupération d'un exercice d'extension du quadriceps. Dans l'étude de Aucouturier et al. (2015) citée précédemment, le nitrate maintenait la perfusion musculaire et limitait les fluctuations de la VO_2 augmentant ainsi l'apport moyen en oxygène lors de la répétition des sprints. La supplémentation en précurseurs de NO pourrait optimiser l'apport en oxygène vers les muscles actifs en augmentant la vasodilatation NO dépendante. L'augmentation de l'apport en oxygène pourrait ainsi augmenter la resynthèse de PCr pendant les phases de récupération et augmenter la résistance sur les phases de sprint.

L'augmentation en précurseur de NO semble donc pouvoir avoir un effet positif sur la performance que ce soit sur les efforts de longue durée, à basse moyenne et haute intensité, ou les efforts supra-maximaux continus ou intermittents. En agissant sur les capacités oxydatives, le NO pourrait augmenter l'économie d'exercice par une moindre consommation d'oxygène, limiter l'accumulation des métabolites perturbant le couplage excitation-contraction, et favoriser la récupération et la resynthèse de PCr.

Influence des fonctions cognitives dans la performance

Les capacités cognitives sont considérées comme un facteur contribuant à la performance à l'exercice ou sportive (McMorris and Graydon, 1996; Martin et al., 2018). Le temps de réaction, la prise de décision, et la programmation de l'action motrice influencent de façon significative la performance, notamment dans les sports collectifs. Plusieurs études se sont intéressées à l'effet des précurseurs de NO sur la fonction cérébrale, et ont montré une augmentation de la perfusion (Haskell et al., 2011; Presley et al., 2011), notamment dans les zones responsables des fonction exécutives, et une amélioration du couplage neurovasculaire (Piknova et al., 2011; Aamand et al., 2013). L'effet des précurseurs de NO sur les fonctions cognitives au repos a été mis en évidence

chez le sujet sain au repos (Thompson et al., 2016) et à l'exercice (Thompson et al., 2015) mais également chez le patient diabétique (Gilchrist et al., 2014). Thompson et al. (2015) ont observé que la supplémentation en nitrate avait un effet sur les fonctions cognitives en diminuant le temps de réaction, pendant un exercice intermittent de haute intensité. Cette différence entre la condition nitrate et placebo était significative dans la deuxième moitié de l'effort. En revanche, la performance cognitive n'était pas améliorée pendant un exercice de répétition de sprint de 20 mètres durant moins de 10 minutes, après la prise aigüe de nitrate (Thompson et al., 2016). Ces résultats suggèrent que la supplémentation en précurseur de NO peut améliorer la performance par diminution de l'altération des fonctions cognitives notamment lors d'effort de longue durée.

Les tests d'effort sur groupe musculaire isolé

En physiologie de l'exercice, il est possible d'évaluer la performance à l'effort en limitant les adaptations cardiorespiratoires par sollicitation d'un seul groupe musculaire isolé (Marillier et al. 2017; Rupp et al. 2015). Ce genre d'effort consiste à produire une contraction volontaire en résistance à un capteur de force, pour évaluer soit la force maximale soit la capacité à répéter des contractions. Nous pouvons différencier ces efforts par les modalités d'exercice utilisées, en fonction de la durée de la contraction, la force développée lors de la contraction, mais aussi la durée et la nature de la phase de relâchement. Ces différentes modalités entrainent des adaptations physiologiques et métaboliques différentes. Très peu d'études ont évalué l'effet des précurseurs de NO sur ce type d'exercice. Porcelli et al. (Porcelli et al. 2016a) ont pu montrer que la supplémentation en nitrate améliorait la performance sur un effort consistant à répéter des contractions à 75% de la force maximale volontaire pendant 3,5 secondes séparées par 10 secondes de repos. Cette amélioration pouvait être expliquée par l'optimisation de la resynthèse de PCr pendant le relâchement, permettant ainsi de limiter les perturbations du métabolisme contractile. Le rapport entre le temps de contraction et le temps de relaxation, ainsi que la force développée, semblent donc jouer un rôle important et pourrait ainsi être un déterminant de l'effet des précurseurs de NO. Ce champ d'application reste donc à explorer.

A retenir sur le chapitre « Les effets des précurseurs de NO »

☺ L'âge, le sexe, le niveau d'entrainement influencent les effets des précurseurs de NO sur la fonction vasculaire et la performance à l'effort,

☺ L'effet des précurseurs de NO dépend des atteintes cardiovasculaires et métaboliques initialement présentes,

☺ La supplémentation en précurseurs de NO améliore les réponses cardiovasculaires à l'hypoxie au repos et à l'exercice,

☺ L'apport en précurseurs de NO semble pouvoir améliorer la performance sur des efforts réalisés à très haute intensité, sur des efforts intermittents ou sur une répétition de sprints, mais également sur des efforts de longue durée type endurance,

☺ La supplémentation en précurseur de NO améliore la fonction cognitive au repos et à l'exercice.

➔ Les effets d'une supplémentation en précurseurs de NO semblent avant tout dépendre de la capacité de synthèse initiale de NO de la population étudiée.

Partie II

CONTRIBUTION PERSONNELLE

Objectifs scientifiques

Cette revue de littérature met en évidence l'intérêt potentiel des interventions nutritionnelles capables d'augmenter la biodisponibilité systémique en NO et ainsi améliorer la fonction vasculaire et la performance à l'effort. L'augmentation de la biodisponibilité en NO semble capable de compenser une production endogène de NO réduite ou insuffisante, ce qui pourrait être une piste thérapeutique intéressante, notamment dans la prise en charge des physiopathologies caractérisées par une dysfonction endothéliale. En plus de l'effet thérapeutique, l'augmentation de la biodisponibilité en NO semble pouvoir optimiser et renforcer la production endogène de NO chez le sujet sain, et ainsi améliorer les réponses à l'exercice, induisant une amélioration de la performance. Cependant, cette revue de littérature montre des résultats contrastés nous amenant à nuancer les effets des précurseurs de NO. Ces effets semblent être dépendants de nombreux facteurs tels que le type d'intervention, l'état de santé des sujets, le niveau d'entraînement, le type de pathologie, ou le type d'exercice étudié. Les effets considérés comme thérapeutiques et/ou ergogéniques d'une intervention visant à augmenter la biodisponibilité en NO restent donc à confirmer.

Bien que l'effet des précurseurs de NO sur la santé et la performance à l'effort restent contrasté, l'effet de l'augmentation de la biodisponibilité en NO au niveau vasculaire semble jouer un rôle évident. À partir de ce constat, nous avons fait l'hypothèse que l'une des raisons qui pouvait expliquer l'absence d'effet était la capacité réelle de ces interventions nutritionnelles à augmenter la biodisponibilité en NO. La synthèse endogène de NO est dépendante d'une part de la quantité de différents substrats (L-arginine, NADH, oxygène) et cofacteurs (tetrahydrobiopterin) disponibles pour la eNOS, et d'autre part de la présence et de l'activité de cette eNOS. Nous avons vu que l'activité de cette eNOS était dépendante de la présence d'oxygène et pouvait être réduite dans le cas d'une hypoxie ou d'une ischémie prolongée. De ce fait, il semble évident que dans le cas d'une dysfonction endothéliale indépendante de la disponibilité en L-arginine, la supplémentation en L-arginine et/ou L-citrulline n'ait pas d'effet significatif sur la biodisponibilité en NO. Concernant la voie NOS-indépendante, nous avons vu que la synthèse de NO par réduction de l'ion nitrite circulant était dépendante de la présence d'un milieu acide, et contrairement à la voie NOS-dépendante, était optimisée par la baisse

du pH. En condition physiologique et dans certains types d'exercice à basse et moyenne intensité, où le pH est stable et la pression en oxygène maintenue, il semble que le nitrite plasmatique, augmenté par la prise orale de nitrate, ne puissent pas ou peu être réduit en NO.

Cette revue de littérature met également en évidence l'importance de la fonction endothéliale dans la performance à l'effort. En effet, la performance à l'effort, et particulièrement l'aptitude aérobie, est dépendante de la fonction vasculaire qui elle-même est majoritairement dépendante de la fonction endothéliale. Cette fonction vasculaire assure et adapte le transport de l'oxygène et des substrats essentiels vers les muscles actifs, afin de répondre aux besoins. Cette aptitude aérobie, dont le critère principal d'évaluation est le VO_2max, est à la fois l'un des principaux facteurs prédictifs de la tolérance à l'exercice, et un puissant prédicteur des risques de maladies cardiovasculaires.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'une supplémentation aigüe en différents précurseurs de NO sur la fonction vasculaire et les performances à l'effort chez le sujet jeune en bonne santé ***(publication 1 et 2)***. La fonction vasculaire a été évaluée indirectement par spectroscopie proche infrarouge lors d'un test d'ischémie-reperfusion sur le membre inferieur. La réponse hyperémique post-occlusive, considérée comme en partie NO-dépendante, était caractérisée par les modifications d'oxygénation tissulaire. La performance à l'effort a été évaluée lors d'un test d'effort incrémental d'extension du quadriceps. La stimulation électrique du nerf fémoral et la stimulation magnétique transcrânienne ont été utilisées pour évaluer les effets du NO sur les mécanismes périphériques et centraux de la fonction neuromusculaire. En parallèle, l'oxygénation cérébrale et musculaire était mesurée en continu tout au long du test par spectroscopie proche infrarouge.

Nous avons ensuite évalué l'effet d'une prise chronique de nitrate et L-citrulline sur la fonction endothéliale et la tolérance à l'exercice chez la personne âgée en bonne santé ***(publication 3)***. En plus de l'évaluation de la réponse hyperémique post-occlusive, la fonction vasculaire a été évaluée par l'analyse de la vitesse d'onde de pouls comme indice de rigidité artérielle, et par les réponses cérébrovasculaires à l'hypercapnie et l'hypoxie. La performance à l'effort a été évaluée lors d'un test d'effort incrémental d'extension du quadriceps, ainsi qu'un test d'effort incrémental maximal sur ergocycle. L'oxygénation

cérébrale et musculaire était mesurée en continu tout au long du test par spectroscopie proche infrarouge.

Pour finir, ces mêmes mesures ont été réalisées chez le sujet jeune en bonne santé avant et après 8 semaines d'entrainement visant à augmenter la puissance maximale aérobie ***(publication 4)***. L'objectif était d'évaluer l'effet synergique d'une prise chronique de nitrate et L-citrulline sur les adaptations cardiovasculaires à l'entrainement.

Méthodologie générale

Compléments alimentaires

Publication 1

Consommation 1h15 avant le début des premières évaluations.

Sachet individuel à mélanger avec 250-350 ml d'eau.

→ 1200 mg de nitrate + 6 g de citrulline

Composition :

- 87 g d'extrait sec de betterave rouge concentré à 1,3 % (13000 ppm) de nitrate,
- 6 g de L-Citrulline pure (cf. flow chart, Annexe 8).

Publication 2

Consommation 1h15 avant le début des premières évaluations.

Sachet individuel à mélanger avec 100 ml d'eau.

→ 520 mg de nitrate + 6 g de citrulline

Composition :

- 41 g d'extrait sec de betterave rouge concentré à 1,3 % (13000 ppm) de nitrate,
- 6 g de L-Citrulline pure (cf. flow chart, Annexe 8).

Publication 3 et 4

Consommation quotidienne à effectuer le matin après le petit-déjeuner.

Pot contenant 35 doses de 53 g. Chaque dose était à mélanger avec 100 ml d'eau.

1 pot pour 4 semaines de supplémentation ***(publication 3)*** et 2 pots pour 8 semaines de supplémentation ***(publication 4).***

→ 520 mg de nitrate + 6 g de citrulline

Composition :

- 13 g d'extrait de salade concentré à 4% (40000 ppm) en nitrate,
- 20 g maltodextrine,
- 10 g d'extrait sec de queue de cerise,
- 6 g de L-citrulline (cf. flow chart, Annexe 8),
- 2 g de saccharose cristallise,
- 1 g d'arôme naturel de fruit rouge.

Les modifications apportées au complément alimentaire avaient pour but d'améliorer les caractéristiques (texture, arôme, galénique…) du complément alimentaire. Les choix effectués pour chaque phase d'expérimentation sont justifiés dans la partie « DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES ; Développement du complément alimentaire ».

Evaluation de la réponse hyperémique post-occlusive

L'évaluation de la fonction endothéliale par l'hyperémie post-occlusive est essentiellement utilisée sur des artères de conductance et repose sur le principe de la vasodilatation débit-dépendante. Cette hyperémie post-occlusive a été décrite comme étant en partie dépendante du NO. En exploration clinique, ce test est maitrisé et pratiqué depuis longtemps dans le dépistage des complications cardiovasculaires et cardiocirculatoires. Appelé test de vasodilatation médiée par le flux, ce test est plus connu sous son acronyme anglais, FMD, pour Flow-Mediated Dilation. Après une période de 5 minutes servant à mesurer les valeurs de repos, un brassard à tension est placé sur le bras gonflé à 50 mmHg au-dessus de la pression systolique. La pression est maintenue pour induire une phase d'ischémie d'une durée de 5 minutes. À la fin des 5 minutes, le brassard est complètement dégonflé et la réponse hyperémique induite en aval du brassard est évaluée par pléthysmographie. L'exploration de la fonction endothéliale dans la physiologie appliquée a fait évoluer ce test, l'adaptant à d'autres systèmes de mesures tels que l'imagerie par résonance magnétique, l'échographie-doppler ou la spectroscopie proche infrarouge, et utilisant l'occlusion soit sur le membre supérieur soit sur le membre inferieur.

Ce type d'investigation a été utilisé pour évaluer l'effet d'une prise aigüe ou chronique de différents précurseurs de NO sur la fonction endothéliale chez le sujet jeune et âgé en bonne santé ***(Publication1, 2, 3 et 4)***. L'occlusion était provoquée de façon proximale sur la cuisse droite pendant une durée de 5 minutes, et la réponse hyperémique post-occlusive était caractérisée par spectroscopie proche infrarouge. Nous avons choisi d'évaluer l'hyperémie post-occlusive sur la cuisse pour différentes raisons: i) Pour le rôle des membres inférieurs dans la locomotion et les exercices utilisés dans ses travaux de recherche, ii) parce que des différences existent dans la vasomotricité entre les membres supérieurs et inférieurs (Newcomer et al. 2004), iii) parce que l'effet de la supplémentation en nitrate semble être amélioré par la proportion de fibre musculaire de type II (McDonough et al. 2005). L'analyse de la réponse hyperémique par spectroscopie

proche infrarouge a été caractérisée par 3 paramètres principaux (figure 16). Le premier est le delta de variation entre la valeur de baseline et la valeur maximale atteinte lors de la phase de reperfusion (Δbaseline/max). Le deuxième est le delta de variation entre la valeur minimale atteinte pendant la phase d'ischémie et la valeur maximale atteinte lors de la phase de reperfusion (Δmin/max). Le troisième correspond à l'aire sous la courbe supérieure à la valeur de baseline lors de la phase de reperfusion. Ce dernier paramètre est intéressant dans le sens ou contrairement aux deux premiers, il est susceptible d'être influencé par la qualité de la reperfusion mais aussi par la durée de celle-ci. Ces trois paramètres ont été appliqués sur les cinétiques enregistrées par la spectroscopie proche infrarouge.

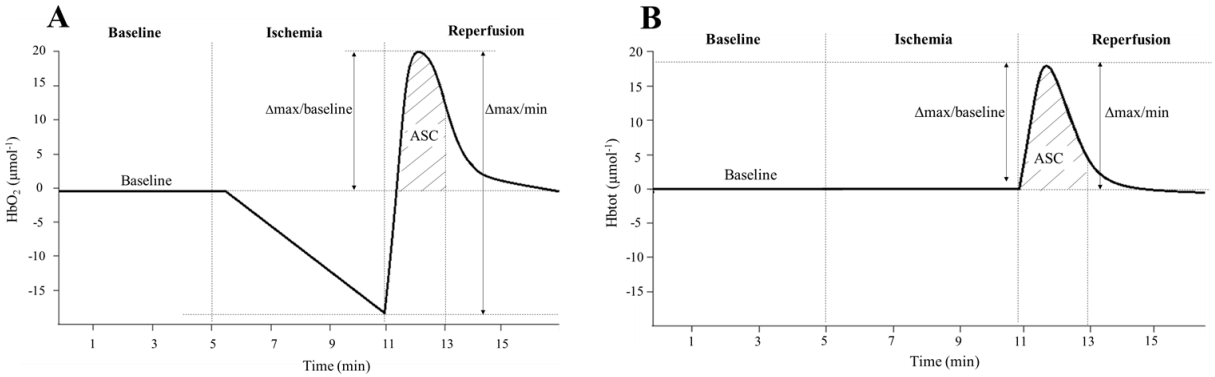


Figure 16. Schéma des paramètres de l'analyse de la réponse post-occlusive lors du test d'ischémie reperfusion

Evaluation de la fonction neuromusculaire

Au cours de ce travail de thèse, ***(Publication 2)*** nous avons évalué l'effet des précurseurs de NO sur la fonction neuromusculaire lors d'un exercice d'extensions isométriques du quadriceps jusqu'à épuisement. Les sujets ont réalisé cette tâche en étant assis avec l'angle de la hanche et du genou fixé à 90°. La force volontaire ou évoquée par stimulation est mesurée via une jauge de contrainte (Captels, St. Mathieu deTreviers, France), la jambe droite des sujets étant attachée ~ 3 cm au-dessus de la malléole externe.

Fatigue neuromusculaire et concepts associés

La production volontaire d'une force musculaire est le résultat d'une succession d'étapes (constituant la fonction neuromusculaire) depuis la planification du mouvement, jusqu'à l'appareil contractile au sein du muscle. Une altération de la fonction

neuromusculaire lors d'une ou plusieurs de ces étapes peut ainsi négativement impacter la production de force (cf. Figure 17). La fatigue neuromusculaire peut ainsi être subdivisée en une composante périphérique, liée à des altérations se produisant au niveau ou en aval de la jonction neuromusculaire, et en une composante centrale liée à des altérations se produisant en amont de cette jonction, et qui se caractérisent par une réduction progressive de l'activation volontaire d'un muscle lors d'un exercice (Gandevia 2001).

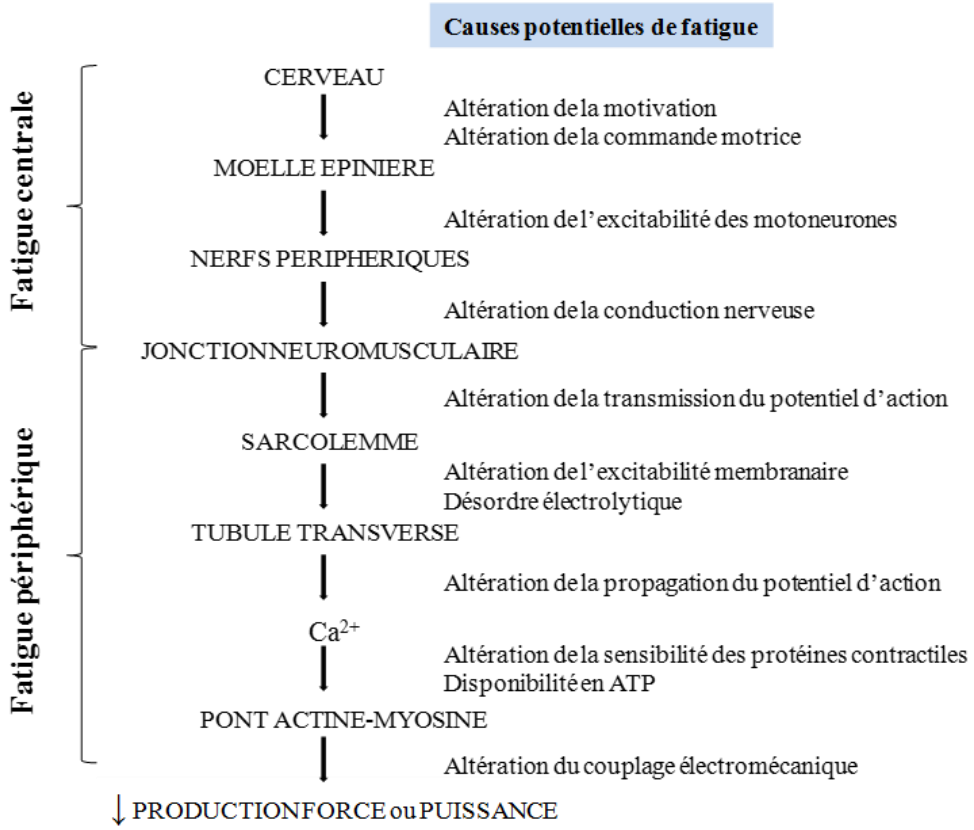


Figure 17. Sites et causes potentiels de la fatigue neuromusculaire (d'après Edwards (1981))

L'évaluation de la fonction et de la fatigue neuromusculaire est généralement réalisée avant le début (sans fatigue), pendant et après différents types d'exercices. Dans ce travail de thèse, cette évaluation a été utilisée lors d'un exercice sur un groupe musculaire isolé afin de limiter les adaptations aigües à l'exercice du système cardiovasculaire et respiratoire, permettant de se focaliser sur le fonctionnement musculaire. Suite à un exercice, l'évaluation la plus directe de la fatigue est obtenue grâce à la mesure de la force induite par une contraction maximale volontaire (CMV, Vøllestad (1997)). Bien que l'étude de la capacité d'un muscle à générer une force soit une

évaluation fiable de la fatigue (Vøllestad, 1997), la mesure de la force maximale volontaire (FMV) et de sa réduction au cours d'un exercice ne permet pas de déterminer l'origine (centrale ou périphérique) de la fatigue neuromusculaire (Gandevia, 2001). Ainsi, afin de déterminer l'origine de la fatigue neuromusculaire, il peut être intéressant d'étudier la réponse musculaire induite par une stimulation électrique du nerf ou du muscle couplée à des enregistrements EMG (électromyographie) et à la mesure de la force. La stimulation magnétique transcrânienne au niveau du cortex moteur peut être utilisée afin d'investiguer les modifications corticospinales (excitabilité et inhibition) se produisant au cours d'un exercice ainsi que dans le but de mettre en évidence la composante supraspinale de la fatigue neuromusculaire (Gandevia 2001; Todd, Taylor, and Gandevia, 2003).

Investigation par stimulation électrique périphérique

→ Composante centrale de la fatigue neuromusculaire

La fatigue périphérique peut être étudiée par stimulation électrique périphérique en stimulant le nerf moteur lorsque le muscle qu'il innerve est relâché. L'intensité optimale doit d'abord être déterminée en augmentant progressivement l'intensité de stimulation afin d'obtenir une réponse mécanique (secousse ou "twitch", Tw) et électrophysiologique (onde M) maximale (Millet et al., 2011). Une intensité supramaximale (120-150% de l'intensité optimale) est utilisée ensuite pour assurer le recrutement d'un nombre maximal d'unités motrices à chaque stimulation. La Tw potentiée, c'est-à-dire appliquée sur un muscle qui vient de se contracter, semble être un indice plus fiable de fatigue périphérique que la Tw non-potentiée (Kufel, Pineda, and Mador, 2002). Cette potentiation correspond à la phosphorylation de chaines de myosine qui induit une augmentation de la sensibilité des protéines contractiles au calcium (Rassier and Macintosh, 2000).

L'onde M représente l'activation de l'ensemble des motoneurones qui innervent un muscle et est le résultat de tous les potentiels d'action générés par la stimulation d'un nerf moteur (Palmieri, Ingersoll, and Hoffman, 2004). Les modifications des caractéristiques de l'onde M peuvent être utilisées pour étudier la propagation des potentiels d'action en direction de la jonction neuromusculaire et au niveau du sarcolemme. Une réduction de l'amplitude de l'onde M provient généralement de l'altération de la transmission des

potentiels d'action au niveau de la jonction neuromusculaire ou à une variation de l'amplitude de ceux-ci au niveau des fibres musculaires (Fuglevand et al. 1993). L'allongement de la durée de l'onde M serait lié à un ralentissement de la propagation des potentiels d'action au niveau du sarcolemme ou à la désynchronisation de la décharge des motoneurones (Scaglioni et al. 2003). Enfin, une augmentation de la latence de l'onde M, qui correspond à la durée entre la stimulation électrique et le début de la réponse électrophysiologique, reflèterait une dysfonction du nerf moteur (Kouzaki et al. 2016).

→ Composante centrale de la fatigue neuromusculaire

L'activation volontaire est définie comme l'intensité de la commande nerveuse descendante vers les muscles sollicités durant un effort (Gandevia 2001). La technique courante pour investiguer le niveau d'activation volontaire (NAV) maximal d'un muscle est la technique de la secousse surimposée ("interpolated twitch technique", Merton (1954)). La composante centrale de la fatigue neuromusculaire est ainsi mise en évidence lorsque ce NAV chute à l'effort. Cette technique consiste à délivrer une secousse unique lors d'une CMV et de comparer l'amplitude de la réponse mécanique surimposée à celle induite par la secousse potentiée sur un muscle relâché (G. M. Allen, Gandevia, and McKenzie 1995).

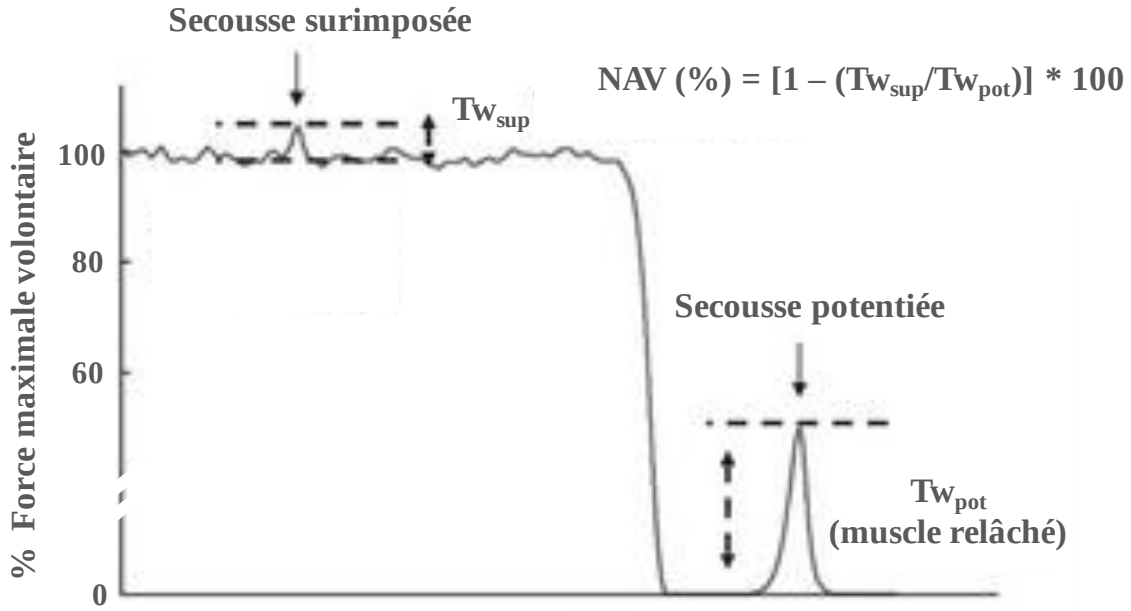


Figure 18. Calcul du niveau d'activation volontaire (NAV) par la technique de la secousse surimposée ("twitch interpolated technique", Merton (1954))

Investigation par stimulation magnétique transcrânienne

La stimulation magnétique transcrânienne (TMS) consiste à appliquer une impulsion magnétique au niveau du cortex cérébral (notamment moteur) induisant une dépolarisation neuronale. La TMS permet d'étudier les modifications des voies corticospinales et le développement de la composante supraspinale (*i.e.* au niveau ou en amont du cortex moteur) de la fatigue neuromusculaire au cours d'un exercice (Gruet et al. 2013). Cette technique présente l'avantage d'être relativement indolore en comparaison à la stimulation électrique corticale.

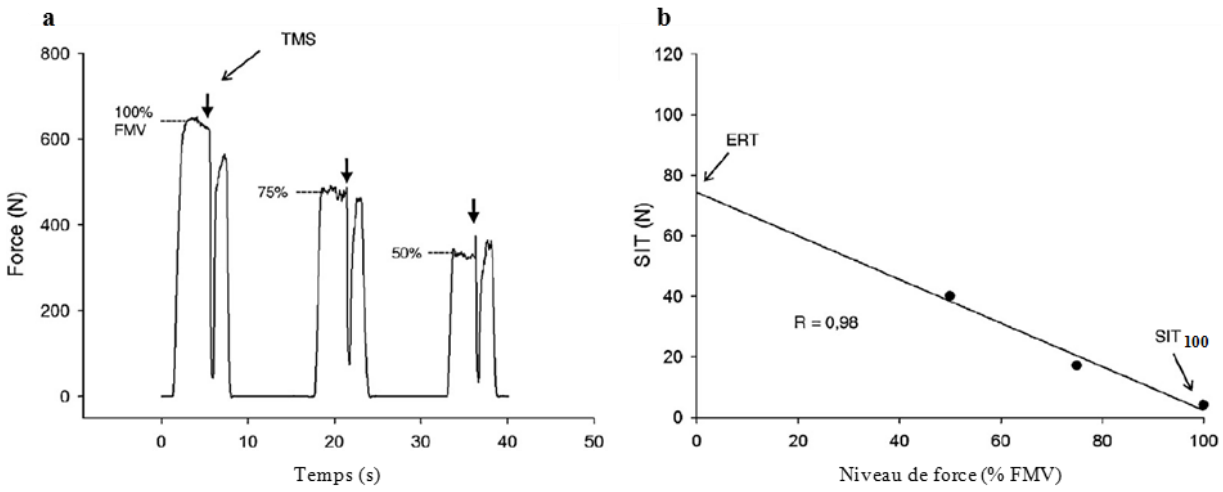
Un potentiel évoqué moteur ("motor evoked potential", MEP) est la réponse électromyographique musculaire à la TMS. Les caractéristiques d'une MEP (e.g. son amplitude) sont le reflet de l'excitabilité des voies corticales et spinales (si normalisation à l'onde M afin d'exclure une modification d'origine périphérique). Afin d'étudier au mieux les modifications de l'excitabilité corticospinale à l'exercice, il est nécessaire que les MEPs soient enregistrées au cours d'une contraction volontaire.

Deux étapes préalables sont nécessaires à une mesure adéquate des MEPs: la détermination du site puis de l'intensité optimale de stimulation. Le site optimal de stimulation pour le groupe musculaire considéré correspond au site pour lequel l'amplitude des MEPs est maximale parmi tous les sites investigués au niveau du cortex moteur (voir (Gruet et al. 2014)) . Le seuil moteur pour déterminer l'intensité optimale de stimulation correspond à l'intensité minimale de stimulation permettant l'obtention d'une MEP déterminé sur muscle contracté (active motor threshold, AMT) lors d'une contraction à faible intensité (Temesi et al. 2014). Une intensité optimale de 120-170% AMT est généralement utilisée (Groppa et al. 2012).

Lors d'une TMS délivrée à une intensité supérieure au seuil moteur pendant une contraction volontaire, une interruption du signal EMG va succéder à la MEP qui a été générée (Fuhr, Agostino, and Hallett 1991). Cette interruption est appelée période de silence ("silent period", SP) et sa durée est de quelques centaines de millisecondes. Elle serait liée à l'activation des récepteurs GABAB, neurotransmetteurs inhibiteurs au sein du système nerveux central (McDonnell, Orekhov, and Ziemann 2006). La durée de la SP est généralement considérée comme un indice de l'inhibition intracorticale (Fuhr, Agostino, and Hallett 1991), sans pourtant exclure une contribution spinale.

Comme évoqué précédemment, la détermination du NAV par stimulation électrique périphérique ne permet pas de déterminer l'origine du déficit d'activation

central (*i.e.* spinale et/ou supraspinale, Millet et al. (2011)). Un déficit d'activation d'origine supraspinale peut être objectivé par la mesure d'une réponse mécanique musculaire ("superimposed twitch", SIT) lors d'une TMS délivrée pendant une CMV, et est interprétée comme une commande corticale sous-optimale (Gandevia et al. 1996). La détermination du NAV par TMS (NAV_{TMS}) nécessite l'estimation de l'amplitude de la réponse mécanique qui serait obtenue par TMS sur muscle relâché ("extrapolated resting twitch", ERT) du fait de la faible excitabilité des voies corticospinales au repos (Todd, Taylor, and Gandevia, 2003). Elle est obtenue grâce à la relation linéaire négative qui existe entre le % FMV sur lequel est appliqué la TMS et l'amplitude de la réponse mécanique mesurée (Todd, Taylor, and Gandevia, 2003). Lorsque cette relation n'est pas suffisamment linéaire ($r < 0.9$), l'ERT n'est pas retenue et le NAV_{TMS} n'est pas calculé pour la série de contractions concernée (voir figure 19 ci-dessous, (S. K. Hunter et al. 2006)). La validité de cette méthode afin de déterminer le NAV_{TMS} a d'abord été démontrée pour les fléchisseurs du coude par Todd et al. (2003) puis validée ensuite pour les extenseurs du genou (Sidhu et al., 2009; Goodall et al., 2009). Une réduction du NAV_{TMS} à l'issue d'un exercice met donc en évidence une fatigue d'origine supraspinale.



$$NAV_{TMS}(\%) = [1-(SIT_{100}/ERT)] * 100$$

Figure 19. Détermination du niveau d'activation volontaire par stimulation magnétique transcranienne

Technique de stimulation	Variables	Paramètres mesurés
Stimulation électrique périphérique	Onde M	Excitabilité du sarcolemme
	Twitch	Contractilité musculaire - Fatigue périphérique
	NAV	Activation volontaire maximale - Fatigue centrale
Stimulation magnétique transcrânienne	MEP	Excitabilité corticospinale
	SP	Durée de l'inhibition intracorticale médiée par $GABA_B$
	SIT	Déficit supraspinal
	ERT	Secousse contrôle estimée pour le calcul du NAV_{TMS}
	NAV_{TMS}	Activation volontaire corticale - Fatigue supraspinale

ERT: secousse contrôle extrapolée (*extrapotaled resting twitch*); LICI: inhibition intracorticale à intervalle long; MEP: potentiel évoqué moteur; NAV: niveau d'activation volontaire; NAV_{TMS}: niveau d'activation volontaire mesuré par stimulation magnétique transcrânienne; SIT: secousse surimposée (*superimposed twitch*); SP: période de silence; SICI: inhibition intracorticale à intervalle court.

Tableau 2. Les différents paramètres de la mesure de fatigue neuromusculaire

Méthodologie de l'évaluation de la fonction neuromusculaire

Electromyographie de surface

Les signaux EMG du vaste médial, du droit fémoral, du vaste latéral et du biceps fémoral ont été enregistrés. Des électrodes de surface de 20 mm ont été utilisées (Contrôle Graphique Medical, Brie-Comte-Robert, France). Afin de diminuer l'impédance entre les différentes paires d'électrodes (< 5kΩ), un rasage et une légère abrasion de la peau sont réalisés avant que celle-ci soit nettoyée avec de l'alcool. Les électrodes étaient positionnées selon les recommandations SENIAM (Hermens et al. 2000). Le signal EMG est amplifié, filtré (5 Hz-1 kHz) et enregistré à une fréquence d'échantillonnage de 2 kHz (BioAmp et PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, Australie).

Stimulation électrique périphérique

La stimulation électrique a été délivrée au niveau du nerf fémoral via une électrode (20 mm, Contrôle Graphique Medical) pressée par l'expérimentateur dans le triangle fémoral afin de minimiser l'intensité de stimulation et l'inconfort associé et une autre électrode placée dans le pli du fessier (patch en gel de 10 cm × 5 cm, Compex SA). Nous avons utilisé une intensité correspondant à 130 % de l'intensité optimale de stimulation

(*i.e.* l'intensité à laquelle la réponse mécanique et l'onde M induite par la stimulation est maximale sur les différents chefs musculaires du quadriceps).

Stimulation magnétique transcrânienne

Un stimulateur magnétique (Magstim 200, The Magstim Company, Dyfed, UK) a été utilisé afin de stimuler le cortex moteur. Une bobine concave à double-cône (110 mm de diamètre) a été placée sur le crâne des participants de manière à activer le cortex moteur gauche (côté opposé à celui réalisant la tâche fatigante). Le site optimal de stimulation correspondait au site pour lequel l'amplitude des MEPs au niveau des différents chefs du quadriceps était maximale lors d'extensions isométriques du genou réalisées à 10% FMV, et une intensité de stimulation fixée à 60% de la puissance maximale du stimulateur ***(publication 2)***. Le site optimal de stimulation est marqué (e.g. sur un bonnet) de manière à assurer la reproductibilité des stimuli pour chaque sujet au cours de l'expérimentation.

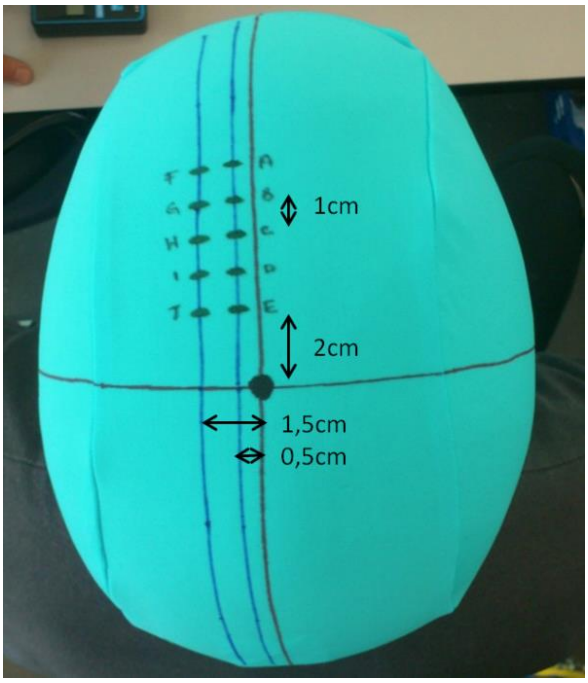


Figure 20. Détermination du site optimal de stimulation pour le quadriceps droit

L'intensité optimale de stimulation (AMT) a été déterminée par courbe de recrutement au cours d'extensions du genou à 10% FMV afin d'induire un minimum de fatigue avant la tâche fatigante. Les sujets ont réalisé 6 contractions consécutives pour chaque intensité de stimulation en commençant à 20% de la puissance maximale du stimulateur, avec 10 s entre chaque contraction et 30 s entre chaque série de 6

contractions. L'intensité de stimulation était augmentée de 5% jusqu'à ce que l'AMT soit atteinte. L'intensité de stimulation qui permettait d'induire plus de 3 MEPs lors de 6 contractions au niveau du vaste médial, du droit fémoral et du vaste latéral était définie comme l'AMT. Nous avons utilisé ensuite une intensité de stimulation qui correspondait à 140% AMT.

Description des évaluations neuromusculaires et paramètres mesurés

Après avoir déterminé l'intensité optimale de stimulation électrique, la FMV du sujet, le site et l'intensité optimale en TMS, des évaluations neuromusculaires avant le début de la tâche fatigante ont été réalisées.

La séquence d'évaluation initiale précédait l'exercice du quadriceps. Elle consistait en une série de 4 contractions répétée à 3 reprises. Une contraction sous maximale 45 % FMV était d'abord réalisée. Lors de cette première contraction, une stimulation du nerf fémoral et une TMS étaient délivrées, permettant une mesure de l'amplitude de l'onde M et de la MEP ainsi que celle de la durée de la SP à ce niveau de force. Après cette première contraction sous-maximale, les sujets ont réalisé une CMV au cours de laquelle une stimulation du nerf fémoral et une TMS étaient délivrées. Une stimulation du nerf fémoral était délivrée sur muscles relâchés 2 s après cette CMV. Enfin, deux contractions à 75 et 50% FMV avec TMS surimposée étaient réalisées. L'ensemble de ces 3 contractions permettait de déterminer l'amplitude de la réponse mécanique évoquée sur muscles relâchés (Tw), le NAV périphérique, le NAV_{TMS}, l'amplitude de l'onde M et des MEPs et la durée des SP à différents niveaux de force.

Après les évaluations initiales, les sujets ont réalisé de façon incrémentale des séries de 33 contractions sous maximales de 5 s entrecoupées de 4 s de repos (5 minutes). La première série était réalisée à 45% FMV. L'intensité était ensuite augmentée de 5% après chaque série jusqu'à épuisement afin de minimiser la variabilité interindividuelle concernant le temps d'endurance et permettre une évaluation de la fatigue neuromusculaire suite à des temps d'effort similaires. Après chaque série, une évaluation intermédiaire était réalisée et consistait en 2 contractions à 45% FMV et une CMV seulement. Les stimulations employées durant cette évaluation étaient identiques à celles présentées précédemment. Le NAV_{TMS} ne pouvait cependant pas être déterminé car les contractions à 75 et 50% FMV n'étaient pas réalisées, ceci de façon à réduire le temps de récupération induit par la répétition de ces contractions et du repos nécessaire entre

chacune d'elles. Immédiatement après l'épuisement, une séquence d'évaluation identique à celle réalisée avant le début de la tâche fatigante était effectuée.

Au cours de ce protocole de fatigue, un feedback visuel de la force produite et de la force cible était proposé aux sujets grâce à un écran placé devant eux. Une bande sonore a été utilisée afin d'indiquer le rythme de contraction et de relâchement au cours de la tâche fatigante. Un schéma détaillé du protocole expérimental est proposé dans la publication concernée par l'évaluation de la fonction neuromusculaire à l'exercice. Les différentes données recueillies au cours de ces deux expérimentations ont été analysées en utilisant les techniques présentées dans la partie consacrée à l'investigation de la fonction neuromusculaire comme décrit ci-avant.

Exploration fonctionnelle à l'exercice

Epreuve d'effort incrémentale maximale.

L'exploration fonctionnelle à l'exercice est un test de diagnostic intégré mettant en jeu simultanément les adaptations musculaires, hémodynamiques, respiratoires et métaboliques (McKelvie and Jones 1989). Celle-ci constitue l'examen de référence afin d'évaluer la tolérance à l'exercice et permet de mettre en évidence les facteurs impliqués dans ses limitations (N. L. Jones and Killian 2000). Les explorations fonctionnelles à l'exercice à charge incrémentale permettent alors la détermination de la puissance maximale aérobie et de la consommation maximale d'oxygène (VO_{2pic}). Ce type d'investigation a été utilisé afin d'évaluer l'effet d'une prise chronique en précurseurs de NO sur la performance à l'exercice chez le sujet jeune et âgé en bonne santé **(*publication 3 et 4*)**. Après une période de repos de 2 minutes, l'épreuve consistait en un protocole d'intensité croissante débutant par un palier de 1 minutes à 50 et 70 watts pour les femmes et les hommes du groupe âgés, et 70 et 90 watts pour les femmes et les hommes du groupe jeunes. La puissance était ensuite augmentée de 10 et 15 watts toutes les minutes pour les sujets féminins et masculins, respectivement, et ceci jusqu'à épuisement. Cette épreuve d'effort maximale a été réalisée sur ergocycle (Ergometrics 800; Ergoline, Bitz, Germany). La fréquence de pédalage était librement choisie par le sujet mais compris entre 70 et 90 tours·min^{-1}.

L'exploration fonctionnelle à l'exercice peut aussi se faire lors d'efforts incrémentaux isolant un muscle ou un groupe musculaire. L'intérêt principal de cette

modalité d'exercice est de limiter les adaptations cardio-respiratoires à l'exercice et d'analyser ainsi de façon plus précise le métabolisme musculaire. Ce type d'investigation a été utilisé afin d'évaluer l'effet d'une prise aigüe en précurseurs de NO sur la fatigue neuromusculaire *(voir chapitre correspondant)* et la performance à l'exercice ***(publication 2)***. Il a également été utilisé afin d'évaluer l'effet d'une prise chronique en précurseurs de NO sur la performance à l'exercice chez le sujet jeune et âgé en bonne santé **(*publication 3 et 4*)**.

Epreuve d'effort à intensité sous-maximale constante.

L'exploration fonctionnelle à l'exercice est possible lors d'exercices constants à durée déterminée ou indéterminée à intensité sous-maximale. Cette modalité d'exercice sollicite également les adaptations musculaires, hémodynamiques, respiratoires et métaboliques. Ce type d'exercice a différents avantages et notamment un qui est la durée plus importante qui est permise du fait de l'intensité sous maximale. Ceci permet d'analyser les réponses physiologiques à iso-intensité dans différentes conditions. Ce type d'investigation a été utilisé ***(publication 3 et 4)*** pour évaluer l'effet d'une prise chronique en précurseurs de NO sur la réponse physiologie à l'hypoxie (FiO_2 0.12) pendant un exercice sur ergocycle.

Paramètres cardiorespiratoires

Les échanges gazeux et la fréquence cardiaque étaient mesurés continuellement par un ergospiromètre de type MetaMax 3B (Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Germany). L'analyseur de gaz et le capteur de débit étaient calibrés avant chaque test. Les paramètres cardiorespiratoires ont été moyennés sur les 20 dernières secondes de chaque palier durant l'exercice maximal et durant la dernière minutes lors des phases de pédalage à intensité sous -maximale. Afin de comparer les performances à l'effort entre les deux groupes de participants, le groupe placebo et le groupe supplémenté, à la même puissance relative et à iso-temps entre les sessions (avant et après la période de supplémentation), les valeurs correspondant au repos, à 25, 50 et 75 et 100% de la puissance maximale atteinte lors du test initial (avant la supplémentation) et à l'épuisement ont été considérées.

Réponse à l'hypercapnie et l'hypoxie

La réactivité cérébrovasculaire représente la capacité des vaisseaux cérébraux à s'adapter à la demande métabolique cérébrale et à maintenir une perfusion adéquate lorsque se produisent des variations des niveaux sanguins d'oxygène ou de dioxyde de carbone. La réponse cardio-ventilatoire représente les modifications de la respiration et du fonctionnement cardiaque à ces mêmes variations d'oxygène et dioxyde de carbone. Ces deux réponses ont été étudiées pour évaluer l'effet de la prise chronique de précurseur de NO sur les réponses à l'hypercapnie et l'hypoxie ***(publication 3 et 4)***. Pour ce faire, les participants ont été installés dans une chaise longue et ont respiré l'air ambiant durant 5 minutes (afin d'obtenir des valeurs de repos). Pour la réponse à l'hypercapnie, les sujets ont ensuite inhalé un mélange gazeux (fraction inspiratoire en O_2 = 0.21; fraction inspiratoire en CO_2 ~ 0.05) afin d'augmenter leur pression de fin d'expiration en CO_2 ($P_{ET,CO2}$) de 10 mmHg. La fraction inspiratoire en CO_2 était continuellement ajustée durant le test afin d'atteindre cette augmentation de 10 mmHg de $P_{ET,CO2}$. Pour la réponse à l'hypoxie, les sujets ont inhalé un mélange gazeux hypoxique (fraction inspiratoire en O_2 = 0.12;). Dans les deux cas les sujets ont inhalé les mélanges gazeux pendant une durée de 5 minutes ue fois les niveaux de fraction inspiré cible atteints. Un mélangeur de gaz de type IsoCap-Altitrainer 200® (SMTEC, Nyon, Suisse) était utilisé afin de délivrer les mélanges en question. L'objectif était d'évaluer l'effet de l'augmentation de la biodisponibilité en NO sur les modifications hémodynamique cérébrale et la réponse cardio-ventilatoire en réponse à ces deux conditions : l'hypercapnie et l'hypoxie.

Les réponses hémodynamiques cérébrales ont été étudiées par spectroscopie proche infrarouge (voir chapitre correspondant). Les réponses cardio-ventilatoires mesurées par la ventilation minute, (VE) ainsi que la fréquence cardiaque (FC) ont été moyennées pendant les 30 dernières secondes de la phase de normoxie et la phase d'hypercapnie ou d'hypoxie. Les réponses à l'hypercapnie ou l'hypoxie étaient ensuite calculées comme suit :

$(VE / Fc_{hypercapnie} - VE / Fc_{normocapnie}) / (P_{ET, CO2, hypercapnie} - P_{ET,CO2, normocapnie})$.

ou

$(VE / Fc_{hypoxie} - VE / Fc_{hypoxie}) / (SpO_{2normoxie} - SpO_{2normoxie})$.

Figure 21. Test de réponse à l'hypercapnie

Spectroscopie proche infrarouge

La spectroscopie proche infrarouge (NIRS) permet l'étude des variations de l'oxygénation tissulaire et de l'hémodynamique au niveau cérébral mais aussi musculaire, en s'intéressant aux concentrations de [HbO_2], [HHb] et [HbTot] en réponse à divers stimuli comme l'exercice ou l'inhalation de mélanges gazeux à concentration en O_2 et CO_2 variables. Au cours de cette thèse, cette technique a été utilisée afin d'étudier l'effet des précurseurs de NO sur ces paramètres tissulaires chez le sujet sain en comparaison à un placebo.

Les variations de [HbO_2], [HHb] et [HbTot] ont été mesurées durant les sessions expérimentales en utilisant un dispositif NIRS à onde continue (Oxymon Mark III, Artinis Medical Systems, Pays-Bas). Ce dispositif permettait également une estimation de la saturation tissulaire (*tissue saturation index*, TSI). L'absorption des chromophores a été étudiée pour une lumière infrarouge émise dont la longueur d'onde était de 780 et 850 nm.

Mesure réalisée au niveau du cortex préfrontal

Au cours des différents protocoles réalisés durant ce travail de thèse, les variations de l'oxygénation tissulaire et de l'hémodynamique ont été investiguées au niveau du cortex préfrontal gauche (entre les repères Fp1 et F3 selon le système international EEG

10-20). La distance interoptode était de 3.5 cm. Le support de la sonde était fixé sur la peau grâce à du ruban double-face et maintenu au niveau du crâne par un bandeau Velcro.

Figure 22. Mesure de la réponse hémodynamique et de l'oxygénation cérébrale par spectroscopie proche infrarouge au niveau du cortex préfrontal gauche

Mesure réalisée au niveau du muscle

Le dispositif était placé au niveau du vaste latéral afin d'étudier la réponse hémodynamique au sein des muscles actifs pendant l'exercice d'extension du quadriceps et l'exercice de pédalage. La distance interoptode était de 4 cm. Comme au niveau du cortex préfrontal, le support de la sonde était fixé sur la peau grâce à du ruban double-face puis recouvert par un bandage pour protéger les optodes de la lumière ambiante.

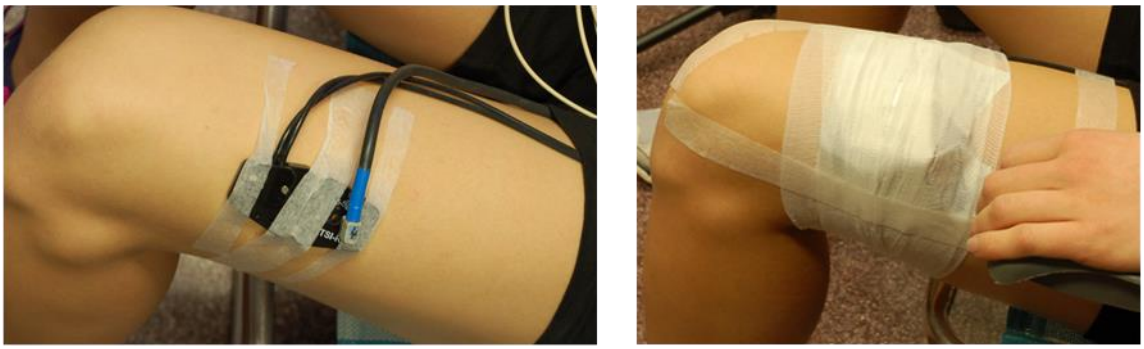


Figure 23. Placement des optodes de NIRS sur le vaste latéral

Recueil et analyse des données

L'acquisition des signaux NIRS a été réalisée grâce au logiciel Oxysoft à une fréquence d'échantillonnage de 10 Hz. [HbO_2], [HHb] et [HbTot] ont été moyennées sur la dernière minute de chaque période d'analyse que ce soit au repos ou à l'exercice à

intensité constante. Cette opération a été répétée à l'exercice lors des 30 dernières secondes de chaque palier ou chaque série de contractions. [HbO_2], [HHb] et [HbTot] ont ensuite été calculées comme la différence:

- Entre les valeurs obtenues à l'issue de chaque palier ou chaque série de contractions et la période de repos qui précède l'exercice.
- Entre les valeurs obtenues à l'issue du test de réponse à l'hypercapnie ou l'hypoxie, et la période de normoxie qui précède.

Mesure de la rigidité artérielle

La rigidité artérielle est conventionnellement évaluée par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP). Il a été démontré que la VOP carotido-fémorale, reflet de la rigidité aortique, est un marqueur du risque cardiovasculaire (Stephane Laurent et al. 2006). Une rigidité aortique élevée est un risque cardiovasculaire majeur et indépendant des autres risques classiques (Vlachopoulos, Aznaouridis, and Stefanadis 2010). Une artère souple et élastique permet d'emmagasiner l'énergie en systole et de la restituer tout au long du cycle cardiaque. Dans une artère souple et élastique, l'onde de pouls se propage lentement. En revanche, dans des artères rigides, l'onde de pouls se propage rapidement. Cette souplesse est dépendante du tonus vasculaire, qui lui-même est en partie dépendant du NO. La VOP mesurée de façon non invasive à l'aide de deux capteurs de pression placés simultanément sur la peau en regard des artères carotide primitive et fémorale commune droite. La mesure est réalisée chez un sujet en décubitus dorsal, au repos depuis quelques minutes. Chaque capteur enregistre l'onde de pression dans l'artère sous-jacente. L'intervalle de temps séparant le début de l'onde carotidienne de celui de l'onde fémorale correspondante (temps de transit carotido-fémoral) est mesuré de façon automatique (Complior®, Alam Medical, Saint Quentin Fallavier, France) et correspond à la VOP carotido-femoral (VOPcf). La VOP est définie par le rapport entre la distance séparant les deux capteurs, mesurée par un mètre ruban, sur le temps de transit carotido-fémoral moyenné sur 10 battements. Ce type d'investigation a été utilisé pour apprécier l'effet de la prise chronique de précurseur de NO sur la vitesse de l'onde de pouls chez le sujet jeune et âgé en bonne santé ***(publication 3 et 4)***. Deux mesures de VOP ont été prises, afin de caractériser la rigidité artérielle. La première est la VOPcf comme décrite ci-avant et la deuxième est la VOP entre l'artère carotide et l'artère pédieuse droite

(VOPcd). Alors que la première est le reflet de la rigidité aortique, la deuxième mesure est un indice de rigidité artérielle périphérique.

Questionnaires

Questionnaire d'activité physique

Nous avons utilisé une version française validée du questionnaire de Baecke (Baecke et al. 1982) afin d'évaluer l'activité physique habituelle auto-rapportée des participants **(*publications 2, 3 et 4)***. Ce questionnaire permet de renseigner un indice d'activité au travail, d'activité sportive et d'activité de loisir. La somme de ces trois indices correspond au score global d'activité physique. Ce questionnaire a été complété par un relevé d'activité physique les jours précédant les jours de tests.

Questionnaires d'habitudes alimentaires

Nous avons créé et utilisé des questionnaires d'habitudes alimentaires pour chacun des protocoles. Ces questionnaires étaient accompagnés de tableaux de relevés des repas pour les 3 derniers jours précédant chaque session d'évaluation. Ces données permettaient d'identifier des profils de participants pouvant être susceptible d'avoir une biodisponibilité en NO élevée du fait de ses habitudes alimentaires.

Résultats

Publication n°1 : Supplémentation aigüe et fonction vasculaire

Effet d'une supplémentation aigüe sur la fonction endothéliale chez le sujet jeune en bonne santé

La revue de littérature précédente a mis en évidence que la supplémentation aigüe en précurseur de NO pouvait augmenter à la fois la concentration plasmatique de nitrite et L-arginine dans le sang, ce qui pouvait potentiellement de façon directe ou indirecte augmenter la biodisponibilité en NO. De plus, nous avons vu que la fonction endothéliale, qui pouvait être évaluée notamment par un test de réponse hyperémique post-occlusive durant un test d'ischémie-reperfusion, était de façon significative dépendante de cette biodisponibilité en NO. Enfin nous avons vu que la synthèse de NO endogène était assurée par les deux voies de production de NO, toutes deux inversement régulées par la pression en oxygène et les conditions d'acidité locale. Alors que l'effet de précurseurs de NO ayant pour but d'optimiser la voie de production de NO, soit NOS-dépendante, soit NOS-indépendante, montre des effets nuancés chez le sujet sain, l'effet de précurseur de NO agissant simultanément sur les deux voies de synthèse de NO n'a jamais été investigué. Ainsi, dans la ***publication 1***, nous avons évalué l'impact de la prise aigüe de précurseurs de NO sur la réponse hyperémique post-occlusive mesurée sur le membre inferieur lors d'un test d'ischémie reperfusion. Ce test d'ischémie reperfusion était effectué 1h15 après l'ingestion de 1200 mg de nitrate et 6 g de L-citrulline ingérée sous forme de jus de betterave concentré en nitrate et enrichie en L-citrulline. Nous avons choisi d'effectuer le test d'ischémie reperfusion sur le membre inférieur pour différentes raisons : parce qu'ils jouent un rôle prépondérant dans la locomotion et dans la performance à l'exercice durant les tests d'endurance et de force utilisée dans l'évaluation des capacités fonctionnelles à l'exercice, parce qu'il peut exister une différence de réponse hyperémique entre les membres inférieurs et supérieurs (Newcomer et al. 2004), et parce que l'effet des précurseurs de NO a été montré comme dépendant du type de fibre (McDonough et al. 2005).

- Publication n°1 -

Effect of acute nitrate and L-citrulline supplementation on muscle microvascular response to ischemia-reperfusion in healthy humans

Thibault Le Roux-Mallouf[1,2], Florence Vibert[1,2], Stéphane Doutreleau[1,2], Samuel Verges[1,2]

[1] U1042, INSERM, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

[2] HP2 Laboratory, Univ. Grenoble Alpes, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

Soumis et accepté: Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism

Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.: 1–8. doi: 10.1139/apnm-2017-0081.

Ce travail a été présenté sous forme de communication orale:

International sports and exercise nutrition conference (ISENC), Newcastle. Décembre 2017.

Résumé

Contexte: Le monoxyde d'azote est un neurotransmetteur impliqué dans le contrôle du tonus vasculaire modifiant le diamètre artériel en condition physiologique et pathologique. Au sein de l'organisme, le NO est synthétisé par deux voies : une voie enzymatique dite NO synthase (NOS) dépendante, et une autre voie NOS-indépendante synthétisant le NO par réduction de l'ion nitrite. L'objectif de cette étude est d'évaluer, chez le sujet sain, l'effet d'une prise aigüe de précurseur de NO visant à optimiser les deux voies de synthèse de NO sur la fonction endothéliale.

Méthodes: 14 sujets ont réalisé deux tests d'ischémie-reperfusion sur le membre inférieur, séparés de 3 jours. Ces sujets ingéraient de façon randomisée soit une boisson contenant 1200 mg (19.4 mmol) de nitrate et 6 g de L-citrulline (N+C) soit un placebo (Pl). Les modifications d'hémoglobine totale (Hbtot) et d'oxyhémoglobine (HbO_2) étaient évaluées par spectroscopie proche infrarouge (NIRS) sur la cuisse et le mollet.

Résultats: Aucune différence entre les conditions N+C et Pl n'a été observée pendant la phase d'ischémie. L'augmentation de Hbtot pendant la phase de reperfusion était plus importante sur la cuisse (e.g. aire sous la courbe, 821±324 *versus* 627±381 $mmol.s^{-1}$, p=0.003) et le mollet (515±285 *versus* 400±275 $mmol.s^{-1}$, p=0.029) en condition N+C comparée à la condition Pl. Aucune différence n'a été observée pour les cinétiques d'HBO_2, autant sur la cuisse (e.g. aire sous la courbe, 842±502 *versus* 770±491 mmol.s, p=0.077) que le mollet (968±536 *versus* 865±275 mmol.s, p=0.075).

Conclusion: L'augmentation d'Hbtot et d'HbO_2 observée en condition N+C suggère une augmentation de la réponse hyperémique post-occlusive qui pourrait être due à l'augmentation de la biodisponibilité en NO induite par l'optimisation des deux voies de synthèse de NO.

Effect of acute nitrate and L-citrulline supplementation on muscle microvascular response to ischemia-reperfusion in healthy humans

Thibault Le Roux-Mallouf[1,2], Florence Vibert[1,2], Stéphane Doutreleau[1,2], Samuel Verges[1,2]

[1] U1042, INSERM, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

[2] HP2 Laboratory, Univ. Grenoble Alpes, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

Corresponding author:

Dr. Samuel Verges

Laboratoire HP2 (U1042 INSERM), Univ. Grenoble Alpes

UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, Avenue Kimberley, 38 434 Echirolles - France

Tel: +33 4 76 76 68 60 - Fax: +33 4 76 76 89 21 - E-mail: sverges@chu-grenoble.fr

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is implicated in vasomotor control mechanisms altering the diameter of the vessels under various physiological and pathological conditions. There are two main NO production pathways, one NO synthase (NOS) independent (nitrate-nitrite–NO) and the other is NOS dependent (L-citrulline-L-arginine-NO). The objective of the study was to evaluate the effect of acute nitrate and L-citrulline supplementation on post ischemic vascular response in healthy subjects. Fourteen subjects performed two leg vascular occlusion tests, 3 days apart. They were randomly assigned to consume a drink containing 1200 mg (19.4 mmol) of nitrate and 6 g of L-citrulline (N+C) or a placebo (Pl). Changes in total hemoglobin (Hbtot) and oxyhemoglobin (HbO_2) concentrations were recorded by near infrared spectroscopy (NIRS) on the thigh and calf muscles. No differences between N+C and Pl were observed during the ischemic period. Hbtot increased to a larger extent during the reperfusion period for the thigh (e.g. area under the curve, 821±324 *versus* 627±381 mmol.s, p=0.003) and the calf (515±285 *versus* 400±275 mmol.s, p=0.029) in the N+C *versus* Pl condition. Similar results were found regarding HbO_2 for the thigh (e.g. area under the curve, 842±502 *versus* 770±491 mmol.s, p=0.077) and the calf (968±536 *versus* 865±275 mmol.s, p=0.075). The larger post-occlusive Hbtot and HbO_2 responses observed after N+C intake suggests a greater post-ischemic vasodilation which may be due to increased NO availability, via the activation of the two main NO production pathways.

Keywords: L-citrulline, nitrate, nitric oxide, vasodilation, NIRS.

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a gaseous signaling molecule linked to a variety of physiological functions in mammalian cells, including the regulation of blood flow, mitochondrial biogenesis, excitation–contraction coupling, calcium handling, oxidative stress and skeletal muscle repair (Hirst and Robson 2011). There are two main pathways of NO production in the vessels: one NO synthase (NOS) dependent and the other NOS independent.

NO is produced endogenously via the L-arginine-NO pathway by the nitric oxide synthase (NOS) enzymes in the endothelium. The endothelial NOS catalyzes the transformation of L-arginine to NO and L-citrulline, in the presence of NADPH, oxygen and cofactors like tetrahydrobiopterin. It is well documented that NOS-derived L-citrulline is efficiently recycled into L-arginine for subsequent NO production (Haines et al. 2011). Importantly, it has been shown that oral L-citrulline supplementation increases the circulating (Kuhn 2002; Schwedhelm et al. 2008; Waugh et al. 2001) and tissue (Wijnands et al. 2012) L-arginine concentration more efficiently than an equivalent dose of L-arginine. Therefore, exogenous L-citrulline administration might represent an interesting alternative to increase the amount of L-arginine to be converted by NOS in NO.

The second pathway for NO production is exogenous since it uses nitrate and nitrite brought by water and food. The nitrate-nitrite-NO pathway has been recognized as an important alternative source of NO in vivo based on the potential for NO synthesis from the simple one-electron reduction of nitrite (Jon O. Lundberg and Weitzberg 2009; Jon O. Lundberg and Govoni 2004). The rate of NOS-independent NO production increases as oxygen saturation falls, suggesting a hypoxia-regulated mechanism of nitrite bioactivation. Maximal reduction of nitrite to NO occurred at hemoglobin oxygen saturation of 50% (Van Faassen et al. 2009). These conditions can exist during vessel occlusion for instance.

Ischemia-reperfusion tests commonly referred to as flow-mediated dilation (FMD) tests, have been widely used to evaluate non-invasively endothelium-dependent vasodilation in humans. FMD testing is well documented to detect, by using Doppler ultrasound or plethysmography, differences in brachial vascular responsiveness in different groups, such as trained *versus* untrained (Rakobowchuk et al. 2008, Birk et al. 2012), or older *versus* young (Parker et al. 2006, Black et al. 2009) individuals. Recently, a new approach to assess vascular responsiveness has emerged by using near-infrared spectroscopy (NIRS) (Gerovasili et al. 2010). Compared to Doppler or plethysmography, NIRS requires no high-cost equipment and

skilled personnel for data acquisition. In addition, while FMD assessed with Doppler provides insight into the vasoreactivity of peripheral conduit artery, NIRS evaluates downstream hyperemia within the tissue itself. Lastly, NIRS provides not only quantitative post-ischemia responses (*i.e.* changes in total hemoglobin concentration, Hbtot) but also qualitative data regarding tissue oxygenation during and after the ischemia (*i.e.* changes in oxyhemoglobin, HbO_2, and deoxyhemoglobin, HHb, concentrations). Hence, NIRS assessment during an ischemia-reperfusion protocol provides a sensitive measure of vascular responsiveness which is able to detect the effect of various interventions (McLay, Nederveen, et al. 2016; McLay, Fontana, et al. 2016).

Studies in humans have shown that an increase in nitrate intake results in a short-term dose-related blood pressure reduction (Larsen et al. 2006, Bondonno et al. 2012(Vikas Kapil et al. 2010) and improves other parameters of vascular function (A. J. Webb, Patel, et al. 2008). There is also data suggesting that nitrate intake results in an increased FMD response of the brachial artery in healthy subjects (Heiss et al. 2012, Lee et al. 2015) and in patients (Velmurugan et al. 2015, Asgary et al. 2016). L-citrulline decreases arterial stiffness in middle-aged men (Ochiai et al. 2012) and attenuates the systolic blood pressure increase in response to cold pressor test in young men (Figueroa et al. 2010b). L-citrulline has shown promise as an intervention for hypertension, reducing both blood pressure and arterial stiffness in obese hypertensive subjects (Figueroa et al. 2012). Taken together, these observations suggest that both nitrate and L-citrulline as NO precursors may improve endothelial function and FMD response in humans.

The present study aimed to assess the effect of acute oral supplementation in NO precursors (both nitrate and L-citrulline) on post-ischemic microcirculation hyperemia evaluated by NIRS in healthy subjects. We chose to assess the ischemia-reperfusion response in the quadriceps and calf muscles for several reasons: i) because of their role in locomotion and exercise performance, ii) because some differences may exist in vasodilatation mechanisms between the upper and lower limbs (Newcomer et al. 2004) and iii) because the effect of NO precursor supplementation depends on muscle fiber type (McDonough et al. 2005). We hypothesized that acute nitrate and L-citrulline supplementation would enhance muscle microcirculation hyperemic response following leg arterial occlusion.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Fourteen subjects (8 men and 6 women) (age, 27.8 ± 7.5 years; body mass, 64.3 ± 9.1 kg; height, 171.5 ± 8.2 cm) were enrolled according to the following inclusion criteria: healthy and active (1 to 3 sessions of physical activity at low to moderate intensity per week), age between 18 and 50 years old, systolic blood pressure <130 mmHg and diastolic blood pressure <90 mmHg, body mass index between 18 and 30 kg/m^2, non-smokers and no medication (except oral contraception). All participants had to be free from any use of food supplements or particular diet. The study was approved by the local ethics committee and performed according to the Declaration of Helsinki. Subjects were fully informed of the procedure and risks involved and gave their written consent.

Protocol design

Each participant was tested on two occasions with a wash-out period of at least three days between both testing sessions. The day before each testing session and on the testing days, they were instructed to adhere to their normal living and dietary routines, to avoid caffeine, nitrate-rich foods such as leafy green vegetables and beetroot, L-citrulline-rich food such as watermelon, dehydration or excessive hydration, and to refrain from using any kind of mouth wash. Nutrition and physical activity before and during the protocol were recorded on a diary and controlled by the investigators. All tests were performed at the same time of the day for each subject, at least 3 h after the last meal. Female subjects were evaluated during their hormonal stable phase to limit the effects on the vascular function (Bartelink et al. 1990).

All subjects consumed either a drink containing 300 ml of NO precursors (N+C) or a 300-ml placebo drink (Pl). Both the experimenters and the subjects were blinded for the composition of the drink. N+C was composed of nitrate rich beetroot juice and L-citrulline. It supplied 1200 mg of nitrate (19.4 mmol) and 6 g of L-citrulline. The placebo was composed of nitrate-free cherry tail juice and was of similar color and taste than the N+C drink. The two supplements had the same carbohydrate profile. Following ingestion of the supplement, the subjects rested in a sitting position. The ischemia-reperfusion test began 90 min after N+C or placebo ingestion in order to allow near maximum values of both L-citrulline and nitrate-nitrite blood concentrations (Moinard et al. 2008, Wylie et al. 2013).

During each test session, subjects were at rest in a comfortable semi-recumbent position. Room temperature was controlled during all tests and light source on the subject's leg was kept minimal to avoid NIRS signal perturbation. A pneumatic cuff (Santelec, Cestas, France) was

positioned proximally on the left thigh. The NIRS optodes were installed on the subject's leg as detailed below. Resting blood pressure was initially measured three times (Digital Blood Pressure Monitor, A&D Medical, Sydney, Australia). After completion of a 5-min baseline phase, a rapid arterial occlusion (<30 s) of the left leg was induced by manual inflation of the pneumatic cuff at 250 mmHg. The cuff remained inflated for 3 to 6 min. The duration of this ischemia phase was dependent on tissue oxygen saturation index (TSI) as measured by NIRS (see below). The cuff was deflated when the TSI was reduced by more than 30% compared to baseline value, but not earlier than after 3 min of ischemia. If this 30% TSI reduction was not reached after 6 min, the cuff was deflated. This duration and TSI amplitude limits were set based on preliminary experiments in order to homogenize the ischemic condition (occlusion duration and amplitude of deoxygenation) between subjects. The arterial cuff was rapidly deflated in less than 5 sec to initiate the reperfusion period. The reperfusion was monitored for a period of 5 min. These three phases (5-min baseline, 3-6-min ischemia, 5-min reperfusion) were performed twice in a row on each test session. The procedure was repeated identically on the two test sessions (N+C and Pl conditions).

NIRS assessment

NIRS assessment on the thigh and the calf was performed with an inter-optode distance of 45 mm. Optodes were connected to a continuous-wave NIRS device (Oxymon Mark III, Artinis Medical Systems, Nijmegen, Netherlands) which generated lights at 857 and 764 nm, enabling differentiation between HbO_2 and HHb. The NIRS device also gave an estimation of the local absolute oxygen saturation through the TSI. NIRS optodes were placed on the distal third of *vastus lateralis* muscle and in the middle of the medial *gastrocnemius* muscle. Optodes were attached to the skin with adhesive stickers to keep the angle and position of the optodes constant. Locations were measured to position the optodes at the same place on each testing day.

NIRS data analysis

Previous studies showed good repeatability for vascular post-ischemic response evaluated by NIRS, with intraday and interday intraclass correlation coefficient of 0.92 and 0.94, respectively, and intraday and interday coefficient of variation of 9±4% and 14±5%, respectively (McLay, Nederveen, et al. 2016). In preliminary experiments, we obtained in our laboratory setting similar repeatability for NIRS assessment of ischemia-reperfusion leg responses (interday intraclass correlation coefficient 0.90 ± 2 and interday coefficient of variation 10 ± 2.1 %; n = 11).

Ischemia-reperfusion NIRS response was characterized by changes in Hbtot concentration as a quantitative index of blood volume, and by changes in HbO_2 concentration as a qualitative index of tissue oxygen consumption during the ischemic phase and tissue oxygen delivery during the post-ischemia phase. Figure 1 shows typical recordings for Hbtot and HbO_2 during the ischemia-reperfusion test.

The following NIRS measurements were analyzed:

(I) Baseline value, *i.e.* the average value during the last minute of the 5-min baseline phase,

(II) Ischemic slope, *i.e.* the slope between the beginning and the end of the ischemia phase (HbO_2 only),

(III) Δmin/baseline, *i.e.* the difference between baseline and the minimal value reached during the ischemia phase (HbO_2 only). The HbO_2 reduction during arterial occlusion as characterized by the ischemic slope and Δmin/baseline is an index of muscle oxygen consumption (Van Beekvelt et al. 2001),

(IV) Δmax/baseline, *i.e.* the difference between baseline and the maximal value reached during the reperfusion phase,

(V) Δmax/min, *i.e.* the difference between the value at the end of the ischemia phase and the maximal value reached during the reperfusion phase,

(VI) AUC, *i.e.* the area under the curve (µmol·s) above baseline value during the first 2 min of the reperfusion phase.

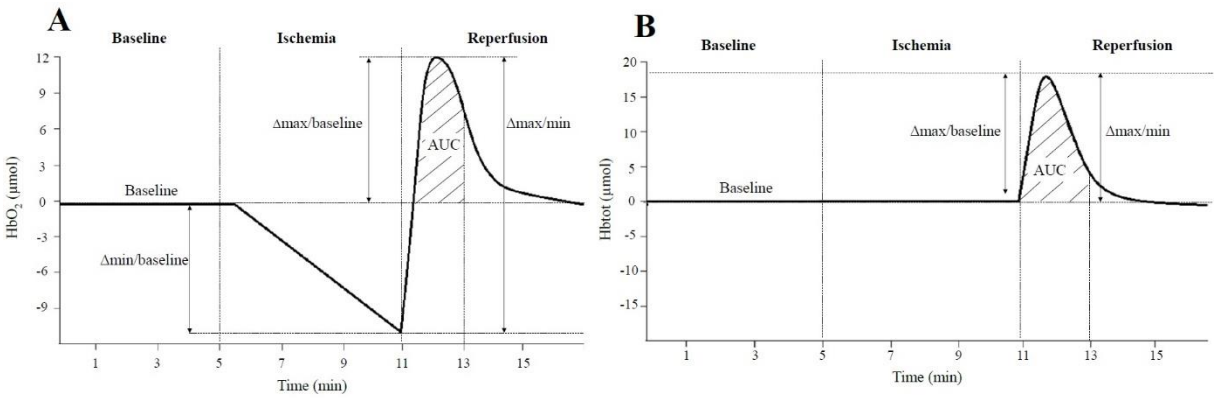


Figure 1. Typical NIRS recording of changes in oxyhemoglobin (A) and total hemoglobin (B) concentrations during the ischemia-reperfusion test. Δmin/baseline, difference between baseline and minimal values reached during the ischemia phase; Δmax/min and Δmax/baseline, difference between the baseline or the value at the end of ischemia phase and the maximal value reached during the reperfusion period, AUC; area under the curve (mmol.s) above baseline value during the first 2 min of the reperfusion phase; HbO_2, oxyhemoglobin; Hbtot, total hemoglobin

Statistical analysis

All NIRS data were analyzed with the Oxysoft software (Artinis Medical Systems) and statistical analysis was performed using Statistica version 10 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Since no difference was observed between the two ischemia-reperfusion protocols on each test session, all values were the average of the two tests performed in each condition (N+C and Pl). N+C and Pl conditions were compared with paired t-test. Cohen's delta (d) determined the effect size and practical significance of N+C supplementation effect. Effect sizes were classified as small if $d \leq 0.2$, medium if $d \approx 0.5$, and large if $d \geq 0.8$ (Lakens 2013). All data are presented as mean values ± SD. The level for significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

No difference in systolic and diastolic blood pressure was observed between N+C (systolic 107 ± 9 mmHg, diastolic 69 ± 5 mmHg) and Pl (systolic 105 ± 8 mmHg, diastolic 68 ± 5 mmHg) conditions (all $p > 0.05$).

Ischemia phase

During the ischemia phase, there was no difference found between N+C and Pl regarding Δmin/baseline and Ischemic slope for Hbtot and HbO_2 both on the thigh and the calf (Table 1). There was no difference either in ischemia duration between the two conditions.

Reperfusion phase

As shown in Figure 2 and Table 1, Δmax/baseline was significantly larger with N+C compared to Pl for Hbtot and HbO_2 on the thigh and on the calf (all $p < 0.05$, all Cohen's $d > 0.72$). Similar significant differences were observed for Δmax/min (all $p < 0.05$, all Cohen's $d > 0.61$) except for HbO_2 on the calf ($p = 0.06$, Cohen's $d = 0.47$). The post-occlusion AUC was larger with N+C compared to Pl for Hbtot only both on the thigh and the calf. The correlation between the amplitudes of the effect of N+C (compared to Pl) measured on the thigh and the calf was significant for some but not all NIRS parameters of reperfusion (Hbtot: Δmax/baseline $r = 0.64$, $p = 0.02$; Δmax/min $r = 0.47$, $p = 0.10$; AUC $r = 0.23$, $p = 0.43$; HbO_2: Δmax/baseline $r = 0.55$, $p = 0.07$; Δmax/min $r = 0.70$, $p = 0.01$; AUC $r = 0.55$, $p = 0.05$).

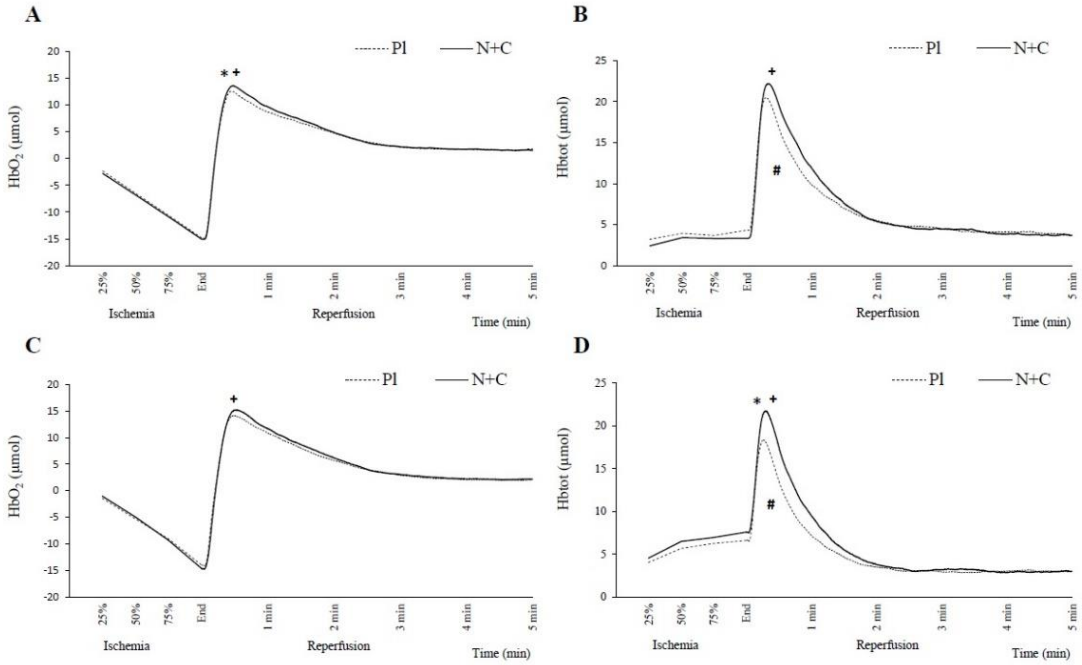


Figure 2. Changes in oxyhemoglobin (thigh panel A, calf panel C) and total hemoglobin (thigh panel B, calf panel D) concentrations during the ischemia and reperfusion phase following supplementation of nitrate and L-citrulline (N+C) and placebo (Pl). HbO_2, oxyhemoglobin concentration; Hbtot, total hemoglobin concentration; 25%, 50%, 75%, percentage of the total ischemia duration; End, end of the ischemia phase; +, significant difference between conditions for Δmax/baseline ($p < 0.05$); *, significant difference between conditions for Δmax/min ($p < 0.05$); #, significant difference between conditions for AUC ($p < 0.05$).

		Thigh				Calf			
		N+C	Pl	p	d	N+C	Pl	p	d
Ischemia phase									
Δmin/baseline (µmol)	**HbO_2**	-16.7 ± 7.68	-16.2 ± 8.47	0.200	-0.24	-15.9 ± 7.31	-15 ± 6.89	0.200	-0.19
Ischemic slope (µmol·s^{-1})	**HbO_2**	-0.1 ± 0.02	-0.1 ± 0.02	0.200	0.24	-0.1 ± 0.03	-0.1 ± 0.02	0.400	0.048
Reperfusion phase									
Δmax/baseline (µmol)	**HbO_2**	13.7 ± 5.0	12.5 ± 4.8	0.010	0.80	15.0 ± 5.8	13.6 ± 5.5	0.010	0.72
	Hbtot	21.3 ± 5.0	19.5 ± 4.2	0.030	0.89	20.0 ± 4.8	16.8 ± 3.8	0.010	0.87
Δmax/min (µmol)	**HbO_2**	30.2 ± 12.1	28.7 ± 12.5	0.020	0.61	30.7 ± 12.2	28.7 ± 12.0	0.060	0.47
	Hbtot	20.5 ± 6.9	17.6 ± 7.8	0.010	1.13	15.3 ± 5.1	12.9 ± 4.3	0.010	0.72
AUC (µmol·s)	**HbO_2**	842 ± 502	770 ± 491	0.077	0.39	968 ± 536	865 ± 275	0.075	0.42
	Hbtot	821 ± 324	627 ± 381	0.003	0.83	515 ± 285	400 ± 275	0.029	0.58

Data are means ± SD; Δmin/baseline, difference between baseline and the minimal value reached during the occlusion period; Δmax/baseline and Δmax/min, difference between the baseline or the value at the end of occlusion period and the maximal value reached during the reperfusion period, AUC, the post occlusion area under the curve (µmol·s) above baseline value during the 2 min after the end of the occlusion; N+C, nitrate and L-citrulline; Pl, placeb; p, p values; d, Cohen's d on N+C supplementation effect.

Table 1. HbO_2 and Hbtot values for ischemia and reperfusion phases following supplementation

DISCUSSION

The objective of our study was to evaluate the effect of acute oral supplementation of NO precursors, nitrate and L-citrulline, on muscle microvascular response during an ischemia-reperfusion test using NIRS. HbO_2 during the ischemic phase, which is an index of oxygen consumption, was similar in both conditions. During the reperfusion phase, there was a larger increase in Hbtot and HbO_2 concentrations after N+C supplementation compared to Pl, indicating a greater hyperemic response. These results suggest that acute supplementation with a combination of nitrate and L-citrulline may increase NO bioavailability and improve endothelial function in the muscle microcirculation.

Baseline blood pressure

No effect of the supplementation was observed on blood pressure. This result contrasts with several studies in the literature on NO precursors, which have reported significant effects on blood pressure. Webb et al. (2008) observed that in healthy subjects, the consumption of a single 500 mL dose of beetroot juice (containing ~22 mmol of nitrate, *i.e.*1400 mg) resulted in a significant reduction in mean blood pressure 2.5 h after ingestion (-10.4 mmHg). However, similar to the present study, they observed no significant change 1 h post-consumption. Another study in athletes showed a 3.7 mmHg reduction in diastolic blood pressure after sodium nitrate supplementation (0.1 mmol/kg/day) for 3 days (F. J. Larsen et al. 2006). Results from a meta-analysis (Siervo et al. 2013) showed that acute and chronic inorganic nitrate supplementation induce a 4.4 mmHg mean reduction in systolic blood pressure. The difference between the present study and the aforementioned studies can be due to the fact that in the present study, participants ingested a single dose of the supplement as opposed to several days of supplementation or to the relatively low dose of nitrate (1200 mg, *i.e.* 19.4 mmol). Regarding L-citrulline, chronic supplementation has been shown to reduce blood pressure in healthy subjects (Figueroa et al. 2011, Ochiai et al. 2012; Figueroa et al. 2010) and has been suggested as a potential treatment for cardiovascular diseases including hypertension (Romero et al. 2006, Figueroa et al. 2011). However, no study has assessed the effect of acute L-citrulline supplementation on blood pressure at rest in healthy subjects.

Ischemia responses

The HbO_2 ischemic slope, representing the local consumption of oxygen during the ischemia (Van Beekvelt et al. 2001), and the Δmin, which was the lowest oxygen level reached at the end of ischemia, were not modified after N+C supplementation. These results suggest no difference in the muscle oxygen uptake at rest between the two conditions during the ischemic phase.

Although the reduced microvascular oxygen availability during ischemia may favor reduction of nitrite to NO, the basal muscle metabolism under resting condition may be associated with oxygen consumption levels that are too low to show an effect of NO precursor supplementation. These results are in line with previous studies showing an effect of L-arginine and L-citrulline supplementation on metabolism and oxygen uptake during exercise (oxygen consumption at submaximal intensity) but not under resting conditions (e.g. (Bailey et al. 2015)). The effect of combined nitrate and L-citrulline supplementation on oxygen consumption and metabolism during exercise will need to be evaluated in future studies.

Post-ischemia reperfusion

Δmax/baseline and Δmax/min for Hbtot and HbO_2 were significantly larger after N+C supplementation compared to placebo. The difference between N+C and placebo reached on average 19% for Hbtot and 10% for HbO_2. The Cohen's d values indicated a medium to large effect size of N+C supplementation on NIRS reperfusion parameters. The post-ischemia AUC was also significantly larger after N+C supplementation compared to placebo for Hbtot (+30%), while a similar tendency was observed for HbO_2 (+11%, $p = 0.07$). These results suggest a greater muscular microcirculation hyperemic response, *i.e.* an increased flow-mediated vasodilation. Previous results also indicate that the post-ischemia hyperemic response is associated with an increased microvascular hematocrit (Kindig et al. 2002, Poole et al. 2013) which could partly contribute to the Hbtot and HbO_2 changes observed in the present study. The N+C supplementation-induced increased vasodilation may have occurred upstream from the muscle microcirculation in conduit arteries and/or in resistance arteries and arterioles within the muscle. In the resistance arterial vasculature, endothelial NOS is responsible for 20–50 % of dilation (Shu et al. 2015) with endothelium derived hyperpolarization (EDH) accounting for the rest of the dilation. In the conduit arteries, NO appears to be responsible for a larger percentage of dilation, up to 100 % of the dilatory response. Hence, as the contribution of NO bioavailability to dilation declines as the vascular tree progresses toward the muscle microcirculation, changes observed by NIRS following N+C supplementation may be mostly the consequence of the increased NO bioavailability and vasodilation in the upstream vessels. Although blood samples were not available in the present study to confirm the increased concentrations of both NO metabolites (nitrate and nitrite) and L-citrulline, previous studies having assessed blood NO precursors 1-2 h after nitrate and L-citrulline acute supplementation have shown significant increase in blood concentrations of NO metabolites and L-citrulline (Wylie et al. 2013; Schwedhelm et al. 2008). These increases in circulating NO metabolites and

L-citrulline were probably responsible for the increased vasodilation after N+C supplementation observed in the present study.

N+C supplementation may have enhanced NO bioavailability through several potential mechanisms. Firstly, an increase of circulating NO may have occurred through the nitrate-nitrite-NO pathway due to enhanced nitrate availability following beetroot juice supplementation. The activity of this pathway is stimulated in specific conditions including acidity or local hypoxemia. NO production from nitrite is enhanced when oxygen saturation falls (Cosby et al. 2003), indicating a hypoxia-regulated mechanism of nitrite bioactivation. Hence, under ischemic conditions, such as in the present study, reduced arterial oxygenation may have been prone to stimulate the NO production from the ingested nitrate. Secondly, increased NO bioavailability after N+C supplementation may have also been induced by stimulating the endogenous NO-production pathway, using L-citrulline, L-arginine and NOS. Because L-citrulline intake may be particularly prone to enhance circulating (Kuhn 2002, Schwedhelm et al. 2008, Wijnands et al. 2012) and tissue (Wijnands et al. 2012) L-arginine concentration, greater bioavailability of L-arginine may have enhanced NO production by NOS after N+C supplementation.

Previous studies have investigated the effects of acute and chronic intake of various amounts of NO precursors on FMD assessed by Doppler ultrasound measurements of the brachial artery in healthy subjects. While no significant change was observed 3 h after acute nitrate supplementation (496 mg sodium nitrate) (Bahra et al. 2012), two studies reported significant improvements (>20%) in brachial artery diameter 1 h and 1.5 h after acute supplementation of 371 or 700 mg sodium nitrate (Rodriguez-Mateos et al. 2015) and 1054 mg (Heiss et al. 2012). Differences in the time between supplement ingestion and assessment of vascular function may explain these contrasting results. In the present study, the time delay between the supplement ingestion and the ischemia-reperfusion test was 1.5 h, which is similar to the time delay used in the above studies showing a nitrate-induced improvement of FMD. The assessment of the effect of L-citrulline supplementation on FMD led to conflicting results. To the best of our knowledge, only one study investigated the effect of acute L-citrulline supplementation (10 g) on reactive hyperemia in healthy young subjects and older adults with heart failure (I.-Y. Kim et al. 2015). No significant effect was observed 1 h following supplementation on forearm blood flow after 3 min of brachial artery occlusion in both groups. Since chronic L-citrulline supplementation has been shown to enhance FMD (Safi et al. 2016), the authors suggested that longer-term L-citrulline supplementation is required to improve vascular function. These results

suggest that the significant effect of acute N+C intake on post-ischemic microvascular hyperemia might be even larger following chronic supplementation.

In contrast to all previous studies, the ischemia-reperfusion response was assessed on the lower limb because of the role of these muscles in locomotion and exercise performance. Although some differences in vasodilation mechanisms exist between the upper and lower limbs (Newcomer et al. 2004), the major role of NO in the FMD response of the femoral artery has been demonstrated (Kooijman et al. 2008) and suggests that N+C supplementation may have enhanced the leg post-ischemic hyperemic response because of increased NO availability. Furthermore, in an animal model, the effect of nitrate supplementation has been shown to depend on muscle fiber type, with a larger nitrate-induced blood flow increase in fast-twitch fibers during exercise (Ferguson et al. 2013, 2015). Lower microvascular oxygen partial pressure in fast-twitch fibers may underline the larger effect of nitrate supplementation (McDonough et al. 2005). The present study demonstrates that even though the *vastus lateralis* and gastrocnemius muscles mostly include slow-twitch fibers, they benefit from nitrate and L-citrulline supplementation in terms of post-ischemia reperfusion. Moreover, the effect of nitrate and L-citrulline supplementation was relatively consistent between the thigh and the calf, as shown by the correlations between the effects observed in each muscle group.

Limitations

Firstly, blood concentrations of L-citrulline and nitrate were not assessed after supplementation. Nevertheless, previous studies have reported significant increases in blood concentrations of NO metabolites or L-citrulline after similar nitrate or L-citrulline acute supplementations (Schwedhelm et al. 2008, Wylie et al. 2013). Secondly, the present study evaluated the effect of a supplement targeting both NOS-dependent and NOS-independent NO production pathways. In order to distinguish the specific effects of nitrate and L-citrulline intake, one should consider comparing the effect of N+C supplementation to nitrate or L-citrulline alone. The effect of chronic N+C supplementation should also be evaluated in future studies since both NO precursors may have distinct effects following chronic *versus* acute ingestion. Thirdly, while the post-ischemia response was assessed on the lower-limb muscles at rest, further studies should evaluate the effect of N+C supplementation on muscle perfusion and metabolism during exercise. The functional consequences of this improved leg muscle vascular reactivity for locomotor activities (e.g. walking or running performances) warrants further investigation. Lastly, we should acknowledge potential limitations regarding NIRS signals which provide measurements of a superficial region of the muscle (□2 cm deep in the present study) and which can be influenced by superficial layers blood flow (Messere and Roatta 2015) NO metabolism

may not however contribute significantly to the cutaneous reactive hyperemia (Wong et al. 2003). Also, because of potential intramuscular heterogeneity (Koga et al. 2007), it should be emphasized that the present results apply to the superficial region of the *vastus lateralis*. NIRS signal is potentially influenced by both hemoglobin and myoglobin concentrations (Samejima and Yang 1964). Previous results demonstrated that myoglobin reoxygenation following several minutes of muscle ischemia occurred within 13 and 19 s after cuff deflation (Brillault-Salvat et al. 1997, Duteil et al. 2004). Therefore, since the maximum Hbtot and HbO_2 signals measured during the reperfusion phase in the present study were observed 28.2 ± 5.1 s after cuff deflation, we believe that the larger NIRS signal with NO precursor supplementation is mostly due to a larger hemoglobin concentration.

Conclusion

The present study shows that nitrate and L-citrulline, which are potent NO precursors significantly increase the lower-limb post-ischemic vascular reactivity as assessed by NIRS in healthy subjects. This supplementation may induce greater vasodilatation due to an enhanced NO production by both NOS dependent and independent pathways. It may represent a relevant intervention to improve muscle performance in healthy subjects as well as in pathological conditions involving impaired vascular function and muscle perfusion.

Acknowledgment. We thank all the subjects for participating in the study, as well as Florence Vibert and Aurélie Diomandé for technical assistance and Monique Mendelson for English editing.

Conflicts of interest. The authors report no conflicts of interest associated with this manuscript

Funding. This work was funded by a contract from Fitness-Boutique©.

REFERENCES

Asgary, S., Afshani, M.R., Sahebkar, A., Keshvari, M., Taheri, M., Jahanian, E., Rafieian-Kopaei, M., Malekian, F., and Sarrafzadegan, N. 2016. Improvement of hypertension, endothelial function and systemic inflammation following short-term supplementation with red beet (Beta vulgaris L.) juice: a randomized crossover pilot study. J. Hum. Hypertens. 30(10): 627–632. doi:10.1038/jhh.2016.34.

Bahra, M., Kapil, V., Pearl, V., Ghosh, S., and Ahluwalia, A. 2012. Inorganic nitrate ingestion improves vascular compliance but does not alter flow-mediated dilatation in healthy volunteers. Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc. 26(4): 197–202. doi:10.1016/j.niox.2012.01.004.

Bailey, S.J., Blackwell, J.R., Lord, T., Vanhatalo, A., Winyard, P.G., and Jones, A.M. 2015. L-citrulline supplementation improves O2 uptake kinetics and high-intensity exercise performance in humans. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 119(4): 385–395. doi:10.1152/japplphysiol.00192.2014.

Bartelink, M.L., Wollersheim, H., Theeuwes, A., van Duren, D., and Thien, T. 1990. Changes in skin blood flow during the menstrual cycle: the influence of the menstrual cycle on the peripheral circulation in healthy female volunteers. Clin. Sci. Lond. Engl. 1979 78(5): 527–532.

Birk, G., Dawson, E., Batterham, A., Atkinson, G., Cable, T., Thijssen, D.H., and Green, D. 2012. Effects of Exercise Intensity on Flow Mediated Dilation in Healthy Humans. Int. J. Sports Med. 34(5): 409–414. doi:10.1055/s-0032-1323829.

Black, M.A., Cable, N.T., Thijssen, D.H.J., and Green, D.J. 2009. Impact of age, sex, and exercise on brachial artery flow-mediated dilatation. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. 297(3): H1109–H1116. doi:10.1152/ajpheart.00226.2009.

Bondonno, C.P., Yang, X., Croft, K.D., Considine, M.J., Ward, N.C., Rich, L., Puddey, I.B., Swinny, E., Mubarak, A., and Hodgson, J.M. 2012. Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: a randomized controlled trial. Free Radic. Biol. Med. 52(1): 95–102. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.028.

Brillault-Salvat, C., Giacomini, E., Jouvensal, L., Bloch, C., Wary, G., and Carlier, P.G. 1997. Simultaneous determination of muscle perfusion and oxygenation by interleaved NMR plethysmography and deoxymyoglobin spectroscopy. NMR Biomed. 10(7): 315–323. doi:10.1002/(SICI)1099-1492(199710)10:7<315::AID-NBM489>3.0.CO;2-X.

Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P., Reiter, C.D., Martyr, S., Yang, B.K., Waclawiw, M.A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K.T., Shields, H., Kim-Shapiro, D.B., Schechter, A.N., Cannon, R.O., and Gladwin, M.T. 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nat. Med. 9(12): 1498–1505. doi:10.1038/nm954.

Duteil, S., Bourrilhon, C., Raynaud, J.S., Wary, C., Richardson, R.S., Leroy-Willig, A., Jouanin, J.C., Guezennec, C.Y., and Carlier, P.G. 2004. Metabolic and vascular support for the role of myoglobin in humans: a multiparametric NMR study. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 287(6): R1441-1449. doi:10.1152/ajpregu.00242.2004.

van Faassen, E.E., Bahrami, S., Feelisch, M., Hogg, N., Kelm, M., Kim-Shapiro, D.B., Kozlov, A.V., Li, H., Lundberg, J.O., Mason, R., Nohl, H., Rassaf, T., Samouilov, A., Slama-Schwok, A., Shiva, S., Vanin, A.F., Weitzberg, E., Zweier, J., and Gladwin, M.T. 2009. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. Med. Res. Rev. 29(5): 683–741. doi:10.1002/med.20151.

Ferguson, S.K., Hirai, D.M., Copp, S.W., Holdsworth, C.T., Allen, J.D., Jones, A.M., Musch, T.I., and Poole, D.C. 2013. Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. J. Physiol. 591(2): 547–557. doi:10.1113/jphysiol.2012.243121.

Ferguson, S.K., Holdsworth, C.T., Wright, J.L., Fees, A.J., Allen, J.D., Jones, A.M., Musch, T.I., and Poole, D.C. 2015. Microvascular oxygen pressures in muscles comprised of different fiber types: Impact of dietary nitrate supplementation. Nitric Oxide Biol. Chem. 48: 38–43. doi:10.1016/j.niox.2014.09.157.

Figueroa, A., Sanchez-Gonzalez, M.A., Perkins-Veazie, P.M., and Arjmandi, B.H. 2011. Effects of watermelon supplementation on aortic blood pressure and wave reflection in individuals with prehypertension: a pilot study. Am. J. Hypertens. 24(1): 40–44. doi:10.1038/ajh.2010.142.

Figueroa, A., Sanchez-Gonzalez, M.A., Wong, A., and Arjmandi, B.H. 2012. Watermelon extract supplementation reduces ankle blood pressure and carotid augmentation index in obese adults with prehypertension or hypertension. Am. J. Hypertens. 25(6): 640–643. doi:10.1038/ajh.2012.20.

Figueroa, A., Trivino, J.A., Sanchez-Gonzalez, M.A., and Vicil, F. 2010. Oral L-citrulline supplementation attenuates blood pressure response to cold pressor test in young men. Am. J. Hypertens. 23(1): 12–16. doi:10.1038/ajh.2009.195.

Gerovasili, V., Dimopoulos, S., Tzanis, G., Anastasiou-Nana, M., and Nanas, S. 2010. Utilizing the vascular occlusion technique with NIRS technology. Int. J. Ind. Ergon. 40(2): 218–222. doi:10.1016/j.ergon.2009.02.004.

Haines, R.J., Pendleton, L.C., and Eichler, D.C. 2011. Argininosuccinate synthase: at the center of L-arginine metabolism. Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2(1): 8–23.

Heiss, C., Meyer, C., Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., Heinen, Y., Luedike, P., Keymel, S., Ayoub, N., Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Kelm, M., and Rassaf, T. 2012. Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. Free Radic. Biol. Med. 52(9): 1767–1772. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.051.

Hirst, D.G., and Robson, T. 2011. Nitric oxide physiology and pathology. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 704: 1–13. doi:10.1007/978-1-61737-964-2_1.

Kapil, V., Milsom, A.B., Okorie, M., Maleki-Toyserkani, S., Akram, F., Rehman, F., Arghandawi, S., Pearl, V., Benjamin, N., Loukogeorgakis, S., Macallister, R., Hobbs, A.J., Webb, A.J., and Ahluwalia, A. 2010. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. Hypertens. Dallas Tex 1979 56(2): 274–281. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536.

Kim, I.-Y., Schutzler, S.E., Schrader, A., Spencer, H.J., Azhar, G., Deutz, N.E.P., and Wolfe, R.R. 2015. Acute ingestion of L-citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 309(11): E915-924. doi:10.1152/ajpendo.00339.2015.

Kindig, C.A., Richardson, T.E., and Poole, D.C. 2002. Skeletal muscle capillary hemodynamics from rest to contractions: implications for oxygen transfer. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 92(6): 2513–2520. doi:10.1152/japplphysiol.01222.2001.

Koga, S., Poole, D.C., Ferreira, L.F., Whipp, B.J., Kondo, N., Saitoh, T., Ohmae, E., and Barstow, T.J. 2007. Spatial heterogeneity of quadriceps muscle deoxygenation kinetics during cycle exercise. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 103(6): 2049–2056. doi:10.1152/japplphysiol.00627.2007.

Kooijman, M., Thijssen, D.H.J., de Groot, P.C.E., Bleeker, M.W.P., van Kuppevelt, H.J.M., Green, D.J., Rongen, G.A., Smits, P., and Hopman, M.T.E. 2008. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. J. Physiol. 586(4): 1137–1145. doi:10.1113/jphysiol.2007.145722.

Kuhn KP. 2002. Oral L-citrulline effectively elevates plasma L-arginine levels for 24 hours in normal volunteers. Circulation 106: II1-766S.

Lakens, D. 2013. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. Front. Psychol. 4. doi:10.3389/fpsyg.2013.00863.

Larsen, F.J., Ekblom, B., Sahlin, K., Lundberg, J.O., and Weitzberg, E. 2006. Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers. N. Engl. J. Med. 355(26): 2792–2793. doi:10.1056/NEJMc062800.

Lee, J.-S., Stebbins, C.L., Jung, E., Nho, H., Kim, J.-K., Chang, M.-J., and Choi, H.-M. 2015. Effects of chronic dietary nitrate supplementation on the hemodynamic response to dynamic exercise. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 309(5): R459-466. doi:10.1152/ajpregu.00099.2015.

Lundberg, J.O., and Govoni, M. 2004. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. Free Radic. Biol. Med. 37(3): 395–400. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027.

Lundberg, J.O., and Weitzberg, E. 2009. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. Arch. Pharm. Res. 32(8): 1119–1126. doi:10.1007/s12272-009-1803-z.

McDonough, P., Behnke, B.J., Padilla, D.J., Musch, T.I., and Poole, D.C. 2005. Control of microvascular oxygen pressures in rat muscles comprised of different fibre types. J. Physiol. 563(Pt 3): 903–913. doi:10.1113/jphysiol.2004.079533.

McLay, K.M., Fontana, F.Y., Nederveen, J.P., Guida, F.F., Paterson, D.H., Pogliaghi, S., and Murias, J.M. 2016a. Vascular responsiveness determined by near-infrared spectroscopy measures of oxygen saturation. Exp. Physiol. 101(1): 34–40. doi:10.1113/EP085406.

McLay, K.M., Nederveen, J.P., Pogliaghi, S., Paterson, D.H., and Murias, J.M. 2016b. Repeatability of vascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy. Physiol. Rep. 4(9). doi:10.14814/phy2.12772.

Messere, A., and Roatta, S. 2015. Local and remote thermoregulatory changes affect NIRS measurement in forearm muscles. Eur. J. Appl. Physiol. 115(11): 2281–2291. doi:10.1007/s00421-015-3208-7.

Moinard, C., Nicolis, I., Neveux, N., Darquy, S., Bénazeth, S., and Cynober, L. 2008. Dose-ranging effects of L-citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. Br. J. Nutr. 99(4): 855–862. doi:10.1017/S0007114507841110.

Newcomer, S.C., Leuenberger, U.A., Hogeman, C.S., Handly, B.D., and Proctor, D.N. 2004. Different vasodilator responses of human arms and legs. J. Physiol. 556(Pt 3): 1001–1011. doi:10.1113/jphysiol.2003.059717.

Ochiai, M., Hayashi, T., Morita, M., Ina, K., Maeda, M., Watanabe, F., and Morishita, K. 2012. Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. Int. J. Cardiol. 155(2): 257–261. doi:10.1016/j.ijcard.2010.10.004.

Parker, B.A., Ridout, S.J., and Proctor, D.N. 2006. Age and flow-mediated dilation: a comparison of dilatory responsiveness in the brachial and popliteal arteries. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. 291(6): H3043–H3049. doi:10.1152/ajpheart.00190.2006.

Poole, D.C., Copp, S.W., Ferguson, S.K., and Musch, T.I. 2013. Skeletal muscle capillary function: contemporary observations and novel hypotheses. Exp. Physiol. 98(12): 1645–1658. doi:10.1113/expphysiol.2013.073874.

Rakobowchuk, M., Tanguay, S., Burgomaster, K.A., Howarth, K.R., Gibala, M.J., and MacDonald, M.J. 2008. Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. AJP Regul. Integr. Comp. Physiol. 295(1): R236–R242. doi:10.1152/ajpregu.00069.2008.

Rodriguez-Mateos, A., Hezel, M., Aydin, H., Kelm, M., Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Spencer, J.P.E., and Heiss, C. 2015. Interactions between cocoa flavanols and inorganic nitrate: Additive effects on endothelial function at achievable dietary amounts. Free Radic. Biol. Med. 80: 121–128. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.009.

Romero, M.J., Platt, D.H., Caldwell, R.B., and Caldwell, R.W. 2006. Therapeutic use of L-citrulline in cardiovascular disease. Cardiovasc. Drug Rev. 24(3–4): 275–290. doi:10.1111/j.1527-3466.2006.00275.x.

Safi, M., Mahjoob, M.P., Nateghi, S., Khaheshi, I., Akbarzadeh, M.A., and Naderian, M. 2016. The Assessment of short-term effect of L-citrulline on endothelial function via FMD to NMD ratio in known CAD patients: A randomized, cross-over clinical trial (Clinical trial number:NCT02638727). Romanian J. Intern. Med. Rev. Roum. Med. Interne. doi:10.1515/rjim-2016-0045.

Samejima, T., and Yang, J.T. 1964. OPTICAL ROTATORY DISPERSION OF SPERM-WHALE MYOGLOBIN AND ITS DERIVATIVES. J. Mol. Biol. 8: 863–871.

Schwedhelm, E., Maas, R., Freese, R., Jung, D., Lukacs, Z., Jambrecina, A., Spickler, W., Schulze, F., and Böger, R.H. 2008. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. Br. J. Clin. Pharmacol. 65(1): 51–59. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x.

Shu, X., Keller, T.C.S., Begandt, D., Butcher, J.T., Biwer, L., Keller, A.S., Columbus, L., and Isakson, B.E. 2015. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 72(23): 4561–4575. doi:10.1007/s00018-015-2021-0.

Siervo, M., Lara, J., Ogbonmwan, I., and Mathers, J.C. 2013. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. J. Nutr. 143(6): 818–826. doi:10.3945/jn.112.170233.

Van Beekvelt, M.C., Colier, W.N., Wevers, R.A., and Van Engelen, B.G. 2001. Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O(2) consumption and blood flow in skeletal muscle. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 90(2): 511–519.

Velmurugan, S., Gan, J.M., Rathod, K.S., Khambata, R.S., Ghosh, S.M., Hartley, A., Eijl, S.V., Sagi-Kiss, V., Chowdhury, T.A., Curtis, M., Kuhnle, G.G., Wade, W.G., and Ahluwalia, A. 2015. Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Am. J. Clin. Nutr.: ajcn116244. doi:10.3945/ajcn.115.116244.

Waugh, W.H., Daeschner, C.W., Files, B.A., McConnell, M.E., and Strandjord, S.E. 2001. Oral L-citrulline as L-arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. J. Natl. Med. Assoc. 93(10): 363–371.

Webb, A.J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S., Rashid, R., Miall, P., Deanfield, J., Benjamin, N., MacAllister, R., Hobbs, A.J., and Ahluwalia, A. 2008. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertens. Dallas Tex 1979 51(3): 784–790. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523.

Wijnands, K.A.P., Vink, H., Briedé, J.J., van Faassen, E.E., Lamers, W.H., Buurman, W.A., and Poeze, M. 2012. L-citrulline a more suitable substrate than L-arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. PloS One 7(5): e37439. doi:10.1371/journal.pone.0037439.

Wong, B.J., Wilkins, B.W., Holowatz, L.A., and Minson, C.T. 2003. Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 95(2): 504–510. doi:10.1152/japplphysiol.00254.2003.

Wylie, L.J., Kelly, J., Bailey, S.J., Blackwell, J.R., Skiba, P.F., Winyard, P.G., Jeukendrup, A.E., Vanhatalo, A., and Jones, A.M. 2013. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 115(3): 325–336. doi:10.1152/japplphysiol.00372.2013.

Publication n°2 : Supplémentation aigüe et performance

Effet d'une supplémentation aigüe sur la performance à l'effort chez le sujet jeune en bonne santé

Nous avons vu, à travers la revue de littérature, que l'amélioration de la fonction endothéliale par augmentation de la biodisponibilité en NO pouvait avoir un effet sur la performance à l'effort. Nous avons vu également que cet effet pouvait être observé notamment sur des efforts d'endurance, en retardant l'apparition de la fatigue. Enfin, nous avons vu que le NO pouvait avoir un effet au niveau périphérique sur le fonctionnement musculaire, mais aussi au niveau cérébral. La première étude de ce travail de thèse, a mis en évidence que la supplémentation en nitrate et L-citrulline semblait pouvoir augmenter de façon significative la biodisponibilité en NO, et ainsi améliorer la fonction vasculaire chez le sujet sain au repos. Bien que les mécanismes physiologiques impliqués dans l'effet ergogénique des précurseurs de NO soient de plus en plus décrits, l'effet sur les cinétiques de fatigue, et notamment de fatigue centrale, pendant un effort épuisant, n'ont jamais été étudiés. Ainsi, dans la ***publication 2***, nous avons évalué l'impact de la prise aigüe de précurseurs de NO sur l'oxygénation musculaire et cérébrale, et sur l'évolution de la fatigue centrale et périphérique lors d'un exercice incrémental d'extension du quadriceps. L'exercice était effectué 1h15 après l'ingestion de 520 mg de nitrate et 6 g de L-citrulline ingérée sous forme de jus de betterave concentré en nitrate et enrichie en L-citrulline. L'évaluation de la fonction neuromusculaire par l'utilisation de stimulations électriques périphériques ainsi que de stimulations magnétiques transcrâniennes a été utilisée afin d'estimer la part de fatigue centrale et périphérique au cours de la tâche fatigante. Nous avons choisi un test d'effort local, utilisant un groupe musculaire isolé pour limiter la part du système cardiovasculaire dans la performance, et analyser ainsi le métabolisme musculaire. Avant l'effort, un test d'ischémie reperfusion (comme décrit dans la ***publication 1)*** était effectué pour évaluer la réponse hyperémique post-occlusive sur le membre inférieur utilisé lors de l'exercice.

- Publication n°2 -

Effects of acute NO precursor intake on peripheral and central fatigue during knee extensions in healthy men.

Thibault Le Roux-Mallouf [1], Julien Laurent [1], Dimitri Besset [1], Mathieu Marillier [1], Julie Larribaut [1], Elise Belaidi [1], Christelle Corne [3], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]

[1] HP2 Laboratory INSERM U1042, Grenoble Alpes University, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

[2] Sport and Pathologies Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France.

[3] Inherited Metabolic Disease Laboratory, Department of Biochemistry, molecular and environmental toxicology biology, biology and pathology institute Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France

Résumé

Contexte: Le monoxyde d'azote est un neurotransmetteur impliqué pour réguler le débit sanguin musculaire et cérébral en fonction des besoins en substrats énergétiques, notamment à l'exercice. De nombreuses études ont montré que l'augmentation de la biodisponibilité en NO pouvait améliorer la fonction musculaire et cérébrale et améliorer la performance. L'objectif de cette étude est d'évaluer, chez le sujet sain, l'effet d'une prise aigüe de précurseur de NO sur l'oxygénation musculaire et cérébrale et la fatigue neuromusculaire centrale et périphérique pendant un exercice.

Méthodes: Durant 4 visites expérimentales, 15 sujets ont réalisé un test d'ischémie-reperfusion suivi par un test sous-maximal d'extension isométrique du quadriceps (5s de contraction / 4s de récupération) à 45% de la force maximale volontaire avec un incrément de 5% toutes les 4 minutes jusqu'à épuisement. Les sujets ingéraient de façon randomisée une boisson contenant soit 520 mg (8.6 mmol) de nitrate (N), soit 520 mg (8.6 mmol) de nitrate et 6 g de L-citrulline (N+C), soit 520 mg (8.6 mmol) de nitrate et 6 g de L-arginine (N+A), soit un placebo (Pl). Les modifications d'hémoglobine totale (Hbtot) et d'oxyhémoglobine (HbO_2) étaient évaluées par spectroscopie proche infrarouge (NIRS) sur la cuisse et le mollet, et la fatigue neuromusculaire a été investiguée par stimulation électrique périphérique et stimulation magnétique transcranienne.

Résultats: La réponse hyperémique post-occlusive avant l'effort était plus importante en condition N+C (10.9±3.3 mmol) et N (10.1±3.7 mmol) comparée à la condition Pl (8.2±2.7 mmol; $p<0.05$). L'augmentation de la biodisponibilité en NO n'a pas eu d'effet ni sur l'oxygénation cérébrale et musculaire à l'effort, ni sur la fatigue neuromusculaire centrale et périphérique. Le nombre de contractions n'est pas non plus impacté par les précurseurs de NO (N 71.9±33.2; N+A 73.3±39.4; N+C 74.6±34.0; PLA: 71.8±39.9; $p>0.05$).

Conclusion: Alors que la supplémentation en précurseur de NO améliore la réponse hyperémique post-occlusive lors du test d'ischémie-reperfusion, le NO ne semble pas le facteur limitant de la perfusion cérébrale et musculaire lors d'un effort d'extension du quadriceps jusqu'à épuisement, au moins chez le sujet jeune en bonne santé.

Mots clefs : monoxyde d'azote, fatigue neuromusculaire, exercice

Effects of acute NO precursor intake on peripheral and central fatigue during knee extensions in healthy men.

Thibault Le Roux-Mallouf [1], Julien Laurent [1], Dimitri Besset [1], Mathieu Marillier [1], Julie Larribaut [1], Elise Belaidi [1], Christelle Corne [3], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]

[1] HP2 Laboratory INSERM U1042, Grenoble Alpes University, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

[2] Sport and Pathologies Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France.

[3] Inherited Metabolic Disease Laboratory, Department of Biochemistry, molecular and environmental toxicology biology, biology and pathology institute Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France

Corresponding author:

Dr. Samuel Verges

Laboratoire HP2 (U1042 INSERM), Univ. Grenoble Alpes

UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, Avenue Kimberley, 38 434 Echirolles - France

Tel: +33 4 76 76 68 60 - Fax: +33 4 76 76 89 21 - E-mail: sverges@chu-grenoble.fr

Keys words: Nitric oxide, neuromuscular fatigue, exercise

6681 words, 77 references

Abstract

Nitric oxide (NO) plays an important role to match blood flow to oxygen demand in the brain and contracting muscles during exercise. Previous studies have shown that increasing NO bioavailability can improve muscle function. This study aims to assess the effect of acute NO precursor intake on muscle and cerebral oxygenation and peripheral and central neuromuscular fatigue during exercise. In four experimental sessions, fifteen healthy males performed a thigh ischemia-reperfusion test followed by submaximal isometric knee extensions (5-s on / 4-s off) at 45% of maximal voluntary contraction with 5% increment every 4 min until task failure. In each session, subjects drank a nitrate-rich beetroot juice containing 520 mg nitrate (N), N and L-citrulline (6 g; N+C), N and L-arginine (6 g; N+A) or a placebo (PLA). Prefrontal cortex and quadriceps near-infrared spectroscopy parameters were monitored continuously. Transcranial magnetic stimulation and femoral nerve electrical stimulation were used to assess central and peripheral determinants of fatigue. Thigh post-ischemic blood volume (HbTot) increase was larger in N (10.1±3.7 mmol) and N+C (10.9±3.3 mmol) compared to PLA (8.2±2.7 mmol; $p<0.05$). Increasing NO bioavailability had no significant effect on muscle and cerebral oxygenation as well as on peripheral and central mechanisms of neuromuscular fatigue during exercise. The number of knee extensions to task failure did not differ between sessions (N 71.9±33.2; N+A 73.3±39.4; N+C 74.6±34.0; PLA: 71.8±39.9; $p>0.05$). As opposed to the post-ischemic hyperaemic response, NO bioavailability may not be the limiting factor for tissue perfusion and oxygenation during submaximal knee extensions to task failure, at least in healthy subjects without cardiovascular dysfunction.

Keys words: Nitric oxide, neuromuscular fatigue, exercise

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous signaling molecule involved in a variety of physiological functions throughout the whole body (Hirst & Robson, 2011). The main pathway for NO production is the endogenous NO-synthase (NOS)-dependent L-citrulline-L-arginine-NO pathway. The endothelial NOS catalyzes the transformation of L-arginine to NO and L-citrulline, in the presence of NADPH, oxygen and cofactors like tetrahydrobiopterin. Another source of NO is exogenous since it uses nitrate and nitrite as NOS-dependent end products brought by water and food. The nitrate-nitrite-NO pathway has been recognized as an important alternative source of NO in vivo based on the potential for NO synthesis from the simple one-electron reduction of nitrite (Lundberg & Govoni, 2004; Lundberg & Weitzberg, 2009). Hence, systemic NO bioavailability can be enhanced by NO precursors supplementation such as L-arginine (Chin-Dusting et al., 2007), L-citrulline (Kuhn, 2002) and nitrate (Lundberg & Govoni, 2004) intake. Importantly, it has been shown that oral L-citrulline supplementation increases the circulating (Waugh et al., 2001; Schwedhelm et al., 2008) and tissue (Wijnands et al., 2012) L-arginine concentration more efficiently than an equivalent dose of L-arginine.

NO regulates vascular tone by activating soluble guanylate cyclase in the perivascular smooth muscle. During physical activities, NO bioavailability is critical for the control of blood flow and oxygen delivery to the contracting muscles. During intermittent handgrip exercise for instance, NOS inhibition reduces muscle blood flow (Gilligan et al., 1994) and total vasodilator responses to muscle contraction (Casey et al., 2013). Conversely, nitrate intake can have a positive impact on muscle contractile function (Hernández et al., 2012; Haider & Folland, 2014; Whitfield et al., 2017). In a recent study for instance, Whitfield et al. (2017) showed that dietary nitrate intake increased skeletal muscle force production during low frequency stimulation by improving calcium handling and phosphocreatine resynthesis. These effects on the contractile properties did not translate however into significant changes in maximum or explosive voluntary force production (Haider & Folland, 2014; Whitfield et al., 2017). Hence, although not entirely elucidated (Figueroa et al., 2017; McMahon et al., 2017), the potential ergogenic effect of NO precursors may be associated with an increased muscle blood flow (Richards et al., 2018) and volume as assessed by near infrared spectroscopy [NIRS; (Alvares et al., 2012; Yavuz et al., 2014)] and an improvement in muscle contractile efficiency (Bailey et al., 2010). Beside its role in cerebral blood flow auto-regulation (White et al., 2000), NO is also an important neurotransmitter and neuromodulator (Dawson & Snyder, 1994) involved in the neurovascular coupling (Garry et al., 2015; Attwell et al., 2010). Increasing NO bioavailability

by nitrate intake enhances cerebral blood flow at rest (Presley et al., 2011), cerebral hemodynamic response to visual stimulation (Aamand et al., 2013) and cerebral blood flow and performance during cognitive tasks (Wightman et al., 2015). Such an increase in cerebral NO bioavailability might improve neurovascular coupling during muscle contraction and thereby attenuate mechanisms of central fatigue during exercise (Gandevia, 2001; Rupp et al., 2015). Hence, as a consequence of improved muscle and cerebral perfusion and oxygenation, whether NO precursor supplementation might reduce the peripheral (mechanisms at or downstream the neuromuscular junction) and central [voluntary activation; (Gandevia, 2001)] components of exercise-induced neuromuscular fatigue and subsequently enhance exercise performance remains to be investigated.

This study aims to compare the effect of nitrate intake alone or together with L-arginine or L-citrulline, on muscle and cerebral oxygenation as well as on the development of peripheral and central neuromuscular fatigue during an isolated knee extension exercise. We hypothesized that acute NO precursor intake would improve cerebral and muscular responses to exercise, with significant improvement in muscle and cerebral oxygenation and delayed reduction in muscle contractility and voluntary activation during exercise, leading to an increased performance. We also hypothesized that these effects would be larger after nitrate and L-citrulline supplementation compared to nitrate alone or nitrate and L-arginine. In order to test these hypotheses, we used NIRS (Perrey & Ferrari, 2017) and neurostimulation techniques (Millet et al., 2011) during an isolated muscle exercise allowing the assessment of the neuromuscular mechanisms of fatigue without large cardiorespiratory responses. To evaluate the effect of the different NO precursor supplementations on vascular reactivity, we also performed an ischemia-reperfusion test as previously described by our group (Le Roux-Mallouf et al., 2017).

Material and methods

Subjects

Fifteen male subjects (age: 28 ± 6 years; height: 179 ± 7 cm; body mass: 73 ± 6 kg) were enrolled according to the following inclusion criteria: healthy and active (maximum 3 sessions of endurance physical activity per week), age between 18 and 30 years old, systolic blood pressure <130 mmHg and diastolic blood pressure <90 mmHg, body mass index between 18 and 30 kg□m-2, non-smoker and no medication. The experimental procedures and potential risks associated with participation in the study were explained, and informed consent was obtained from each subject. The study was approved by the local ethics committee (CPP Sud-

Est V, 2014-A01876-41) and performed according to the Declaration of Helsinki.

Study design

This is a double blind, randomized, cross-over study. Each subject was tested, after a familiarization session, on four occasions after intake of a beverage containing NO precursors or a placebo. A wash-out period of at least four days separated each experimental session. During the three days before each experimental session and on the experimental day, subjects were instructed to adhere to their normal living and dietary routines, to avoid caffeine, nitrate-rich foods and L-citrulline-rich food and to avoid dehydration or excessive hydration. Nutrition and physical activity before and during the protocol were recorded on a diary and controlled by the investigators. All tests were performed at the same time of the day for each subject, at least 3 h after the last meal.

Before and 60 min after intake of the NO precursors or placebo beverage, systolic and diastolic blood pressures were measured (Digital Blood Pressure Monitor, A&D Medical, Sydney, Australia). Venous blood sampling was performed 65 min after beverage intake, immediately followed by an ischemia-reperfusion test on the lower limb to evaluate the NO dependent vasodilation (see below). Then, subjects performed an incremental intermittent isometric knee extension test starting 90 min after beverage intake in order to allow near maximum values of both L-citrulline, L-arginine and nitrate-nitrite blood concentrations (Moinard et al., 2008; Wylie et al., 2013). Before, during and after the knee extension test, neuromuscular evaluations were performed with transcranial magnetic stimulation (TMS) and femoral nerve electrical stimulation (FNES) to assess voluntary activation (VA), motor cortex excitability, neuromuscular transmission and muscle contractility. Electromyography (EMG) signals of the quadriceps muscles were measured continuously. Cerebral and muscle oxygenation were continuously assessed by NIRS during exercise (see Figure 1 for an overview of the experimental protocol).

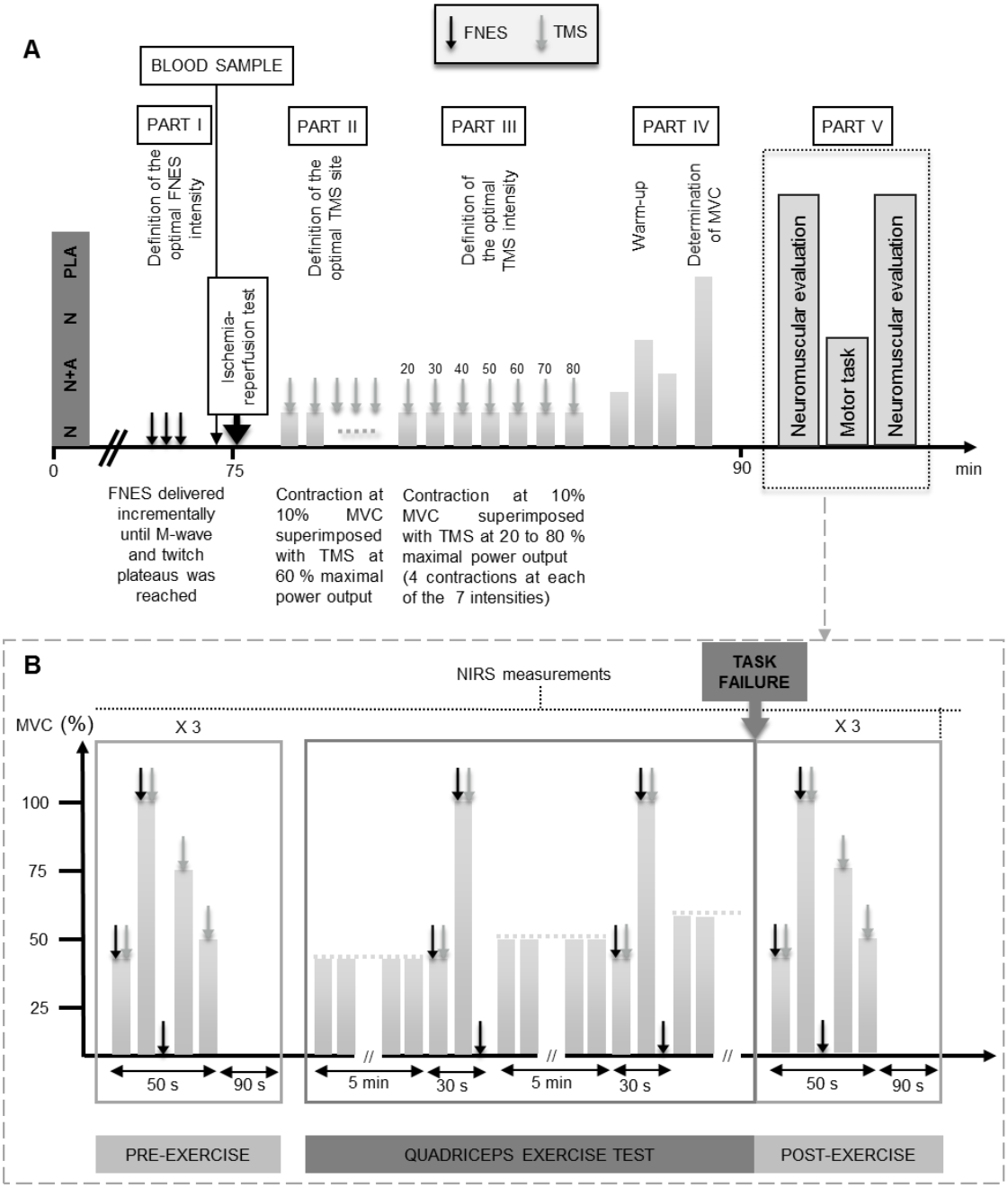


Figure 1. Overview of the neuromuscular evaluation (panel A) and of the knee extension exercise test (panel B). Panel A: part I, Optimal femoral nerve electrical stimulation (FNES) intensity; part II and part III, optimal transcranial magnetic stimulation (TMS) site and optimal TMS intensity were determined; part IV, warming up and determination of MVC were performed; part V, neuromuscular evaluations and knee extension exercise test. Panel B: the knee extension exercise test consisted in 3 identical sets of neuromuscular evaluations (PRE), followed by bouts of 32 submaximal contractions interspaced by neuromuscular evaluations until task failure (knee extension exercise test) and ended by 3 sets of neuromuscular evaluations (POST) similar to PRE.

Familiarization session

During an initial visit to the laboratory, each subject was familiarized with TMS, FNES, ischemia-reperfusion test and with the isometric knee extension ergometer for performing submaximal and maximal voluntary contractions. After a standardized warm-up (5 min of submaximal knee extensions) and measurement of maximal voluntary contraction (MVC), the subjects performed intermittent isometric knee extensions at 45% MVC until task failure (see below).

NO precursors and placebo intake

In each session, subjects first drank one of three different beverages with NO precursors or a placebo. The first NO precursor beverage contained 120 ml of nitrate-rich beetroot juice (520 mg nitrate) (N), the second contained 120 ml of nitrate-rich beetroot juice (520 mg nitrate) and L-citrulline (6 g) (N+C) and the third contained 120 ml of nitrate-rich beetroot juice (520 mg nitrate) and L-arginine (6 g) (N+A). The placebo beverage (PLA) contained 120 ml of nitrate-free cherry tail juice and was of similar colour and taste than the three other beverages. All supplements had the same carbohydrate profile. Both the experimenters and the subjects were blinded for the composition of the drink. Following intake of the beverage, the subjects rested in a sitting position.

Blood sampling

Blood was sampled from the antecubital vein and immediately centrifuged (2400g, 4°C, 10 min), plasma was separated and stored at -80°C. Blood nitrite concentration was determined spectrophotometrically using the Griess reaction. Blood nitrate concentration was also determined by the Griess reaction on nitrite concentrations after enzymatic conversion of nitrate to nitrite by nitrate reductase. The reaction is followed by colorimetric detection of nitrite as an azo dye product of the Griess Reaction. The Griess Reaction is based on the two-step diazotization reaction in which acidified nitrite produces a nitrosating agent, which reacts with sulfanilic acid to produce the diazonium ion. This ion is then coupled to N-(1-naphthyl) ethylenediamine to form the chromophoric azo-derivative which absorbs light at 540-570 nm (Miles et al., 1996). Blood L-citrulline and L-arginine was determined by ultra-performance liquid chromatography. Deproteinised samples were derivatized (reagent AccQTag Ultra, Waters, Guyancourt, France), the amino acids are separated on column (CORTECS C18 Columns, Waters, Guyancourt, France), and then detected by mass spectroscopy (ACQUITY QDa, Waters, Guyancourt, France).

Ischemia-reperfusion test

During each experimental session, 75 min after beverage intake, an ischemia-reperfusion test was performed on the right leg. Subjects staid at rest in a comfortable seated position. A pneumatic cuff (Santelec, Cestas, France) was positioned proximally on the right thigh. NIRS optodes were installed on the subject's leg as detailed below. After completion of a 5-min baseline phase, a rapid arterial occlusion (<30 s) of the right leg was induced by manual inflation of the pneumatic cuff at 250 mmHg. The cuff remained inflated for 5 min. Then, the cuff was rapidly deflated (<5 s) to initiate the reperfusion phase. The reperfusion was monitored for a period of 5 min. During the reperfusion phase, kinetics of NIRS signals were recorded to evaluate post-ischemic NO-dependent vasodilation as previously described (Le Roux-Mallouf et al., 2017).

Electromyographic recordings

The EMG signals of the right *vastus lateralis* (VL), *vastus medialis* (VM), *rectus femoris* (RF) and *biceps femoris* (BF) muscles (as a surrogate for antagonist hamstring muscles) were recorded using bipolar silver chloride surface electrodes of 20-mm diameter (Contrôle Graphique Medical, Brie-Comte Robert, France) during the voluntary contractions and electrical/magnetic stimuli. The recording electrodes were secured lengthwise to the skin over the muscle belly following SENIAM recommendations (Hermens et al., 2000), with an inter-electrode distance of 20 mm. The positions of the EMG electrodes were marked on the skin with indelible ink on the first experimental session to ensure that they were placed in the same location at subsequent visits. The reference electrode was fixed over the patella. Low impedance ($Z < 5$ kΩ) at the skin surface was obtained by abrading the skin with fine sand paper and cleaning with alcohol. EMG signals were amplified, band-pass filtered (5 Hz-1 kHz, input impedance = 200 MΩ, common mode rejection ratio = 85 dB, gain = 1,000) and recorded at a sampling rate of 2 kHz using BioAmp and PowerLab systems (ADInstruments, Bella Vista, Australia) to be stored on a computer for subsequent analysis with LabChart 7 software (ADInstrument).

Femoral nerve electrical stimulation (FNES)

Single electrical stimuli of 1 ms duration were delivered via a high-voltage (maximal voltage, 400 V), constant-current stimulator (DS7A; Digitimer, Welwyn Garden City, UK) to the right femoral nerve via a 20-mm-diameter surface cathode located in the femoral triangle (Meditrace 100; Covidien) and a 50 mm x 90 mm rectangular anode (Durastick Plus; DJO Global, Vista, CA, USA) located in the gluteal fold. Single stimuli were delivered incrementally to the relaxed

muscle until plateaus in both resting M-wave (Mmax) and twitch (Tw) amplitudes were reached (Figure 1A Part I). The stimulus intensity was set at 40% above the level required to produce Mmax and maximal Tw responses throughout the experimental session (mean stimulation intensity used: 98 mA).

Transcranial magnetic stimulation (TMS)

A magnetic stimulator (Magstim 200; The Magstim Company Ltd, Whitland, UK) was used to stimulate the motor cortex. Single TMS pulses of 1 ms duration were delivered via a concave double-cone coil (110 mm diameter, maximal output of 1.4 T) to stimulate the left motor cortex preferentially, contralateral to the right leg. The coil was manually controlled by an experienced investigator throughout the protocol. Subjects wore a cap on which lines were drawn between the pre-auricular points and from nasion to inion to identify the vertex. Every centimeter, from 2 to 6 cm anterior to the vertex, was demarcated along the nasal–inion line, with space of 0.5 and 1.5 cm. At each point, a stimulus was delivered at 60% maximal stimulator output during brief (~ 2–3 s) voluntary contractions of the knee extensors at 10% MVC to determine the optimal TMS site (Figure 1A Part II).

The coil was positioned at the site evoking the largest RF motor evoked potential (MEP) amplitude with minimal BF MEP amplitude (Rupp et al., 2012). This coil position was drawn onto the cap and used throughout the experimental session. Real-time visual feedback of target force levels was provided to the subject on a computer screen throughout the experiment. During all voluntary contractions, TMS was delivered once the subject had contracted to the appropriate force level and the force had stabilized. A stimulus–response curve at 10% MVC was used to determine optimal TMS intensity (Figure 1A Part III), as described by Temesi et al. (2014). Subjects performed brief contractions (~ 2–3 s) at 10% MVC of the knee extensors with TMS delivered four consecutive times at each of the following randomly ordered stimulus intensities: 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80% maximal stimulator output. Stimuli were delivered at 15 s intervals. Optimal stimulus intensity was selected by identifying the minimal stimulus intensity to evoke maximal MEP amplitude (*i.e.* the lowest intensity resulting in an increase of <5% MEP amplitude at higher stimulus intensities) in all four quadriceps muscles. BF MEP amplitude was examined to verify that optimal stimulus intensity did not induce co-activation of antagonists muscles (Todd et al., 2003). 140% of the determined optimal stimulus intensity was used throughout the experimental session (mean stimulation intensity used: 59 ± 12 % maximal stimulator output).

As fatigue-induced changes in parameters elicited by TMS (e.g. MEP) may depend on muscular

state [*i.e.* relaxed *versus* contracted muscle, low *versus* high contraction intensities, for review see (Gruet et al., 2013)], we assessed corticospinal changes (MEP and cortical silent period, SP) at different force levels (45% and 100% MVC). The subjects were instructed to return as quickly as possible to the target force level after each TMS pulse elicited during voluntary contractions to allow valid assessment of SP (Mathis et al., 1998). Strong verbal encouragement was given throughout the protocol.

Near infrared spectroscopy (NIRS)

Oxy[HbO_2]-, deoxy[HHb]- and total[HbTot]-hemoglobin concentration changes were estimated throughout testing sessions over multiple sites using a two-wavelength (780 and 850 nm) multichannel, continuous wave NIRS system (Oxymon MkIII, Artinis Medical Systems, the Netherlands). Quadriceps muscle hemodynamic was assessed from the right VL using a 4-cm interoptodes distance. Probe holder was secured to the skin using double-sided tape and covered with a black sweatband to shield the optodes from ambient light. Left pre-frontal cortex hemodynamic was assessed between Fp1 and F3 locations according to the international 10–20 EEG system with 3.5-cm interoptodes distance. The probe holders were secured to the skin with double-sided tape and maintained with Velcro headbands. Data were recorded continuously at 10 Hz and filtered with a 1-s width moving Gaussian smoothing algorithm before analysis.

Knee extension exercise test

The protocol consisted of baseline measurements (PRE), an intermittent isometric incremental fatiguing exercise of the quadriceps muscles performed to task failure and post-exercise measurements (POST) (Figure 1 Part V). Three identical sets of contractions separated by a 90-s rest period were performed both at PRE and at POST (Figure 1B). Each set comprised four contractions at 45%, 100%, 75% and 50% MVC. All voluntary contractions lasted ~ 5 s. First FNES and TMS (fixed order) were delivered ~2 s apart during 45% and 100% MVC contractions. Then, one more FNES was delivered immediately after 100% MVC in relaxed muscle, before TMS was delivered during 75% and 50% MVC contractions. The 75% and 50% MVC force levels were recalculated for each set based on the preceding 100% MVC. The knee extension exercise test consisted of repeated intermittent isometric knee extensions performed until task failure (Figure 1B). The subjects following a soundtrack performed bouts of 32 intermittent submaximal isometric contractions (5-s on / 4-s off, total bout duration: 5 min) interspaced by neuromuscular evaluations lasting 30 s. Target force during contractions was 45% of MVC (measured at PRE; Figure 1A Part IV) during the first bout of contraction, after which it was increased by 5% MVC every bouts. Interspaced neuromuscular evaluations

between bouts consisted in FNES and TMS delivered ~ 2 s apart during the last 45% MVC contraction of the bout and during a MVC contraction before a last FNES was delivered immediately after MVC in relaxed muscle. The progressive increase in target force during the knee extension exercise was performed to reduce inter subject differences in exercise duration since preliminary experiments showed very large time to task failure in some subjects when target torque remained constant at 45% MVC. Task failure was defined as the inability of the subject to perform three consecutive contractions adequately (*i.e.* if the contraction was not of 5-s duration or if the mean contraction torque was lower than the target torque for >2s).

Data analysis

Mmax was measured from single-pulse FNES. The VA measured by FNES (VAFNES) was assessed by twitch interpolation (Merton, 1954). The amplitude of the superimposed twitch (SIT) elicited by FNES during a brief MVC was compared with the amplitude of the subsequent Tw in relaxed muscle using the following equation:

$$\text{VAFNES (\%)} = [1 - (\text{SIT}/\text{Tw})] \times 100$$

MEP peak-to-peak amplitudes of quadriceps muscles during TMS surimposed at 45% and 100% MVC were normalized to Mmax at the same time point. The duration of SP during contractions at 100% MVC (SP100) and 45% MVC (SP45) was determined visually and defined as the duration from stimulus to the return of continuous voluntary EMG (Damron et al., 2008). Given that similar results were obtained for all quadriceps muscles [*i.e.* no interaction effect (time × muscle or supplementation × muscle) was found for any MEP or SP parameters], MEP amplitudes and SP durations from the VL, RF, VM were averaged and used for further analysis.

The voluntary activation measured by transcranial magnetic stimulation (VATMS) was assessed using the method previously described (Todd et al., 2003) and validated for the knee extensors (Sidhu et al., 2009; Goodall et al., 2009). The amplitude of the Tw elicited by TMS in relaxed muscle was estimated rather than measured directly because motor cortical and spinal excitability increase with increasing muscle activity (Rothwell et al., 1991). This estimated resting twitch (ERT) was calculated by extrapolation of the linear relationship between the SIT amplitude and voluntary force during brief maximal and submaximal contractions using three points (50%, 75% and 100% MVC). One regression analysis was performed for each set of brief contractions, and the y-intercept was taken as the ERT. The VATMS was then calculated using the following equation:

$$\text{VATMS (\%)} = [1 - (\text{SIT during MVC}/\text{ERT})] \times 100$$

When linear regressions were not linear ($r < 0.8$), ERT was excluded and VATMS was not calculated for the considered set of contractions. ERT was linear for all subjects for at least one set at PRE and POST, permitting VATMS to be determined in all subjects.

Peak forces measured during stimulation, MEP, SP, Mmax, VAFNES and VATMS at PRE and POST were calculated as average values obtained during the three sets of contractions. Mean EMG root mean square during the knee extension exercise test was calculated for each contraction bout and during MVC (RMSMVC) and was normalized to Mmax. HbO_2, HHb and HbTot concentrations were changes from the beginning value during first 30 s of knee extension exercise for each experimental session.

Ischemia-reperfusion NIRS response was characterized by changes in HbTot concentration as a quantitative index of blood volume and by changes in HbO_2 concentrations as a qualitative index of tissue oxygen delivery during the post-ischemia phase. During the reperfusion phase, the difference between the value at the end of the ischemia phase and the maximal value reached during the reperfusion phase (Δmax/min) represents the lower-limb post-ischemic vascular reactivity (McLay et al., 2016a, 2016b).

Owing to the between-subject variability in time to task failure, all data during the knee extension exercise test were normalized as a percentage of endurance time (Lévénez et al., 2008). Data from the four experimental sessions were compared at different time points: i) before the knee extension exercise test (PRE, for neuromuscular evaluations only) or during the first 30 s of the knee extension exercise test (Beginning, for NIRS data only), ii) at 50% of the duration of the shortest exercise test (from the four experimental sessions) for a given subject (50%), iii) last 30 s of the knee extension exercise test (for NIRS data only) or at the first set of contraction following task failure (for neuromuscular evaluations only; task failure), and iv) after the knee extension exercise test (for neuromuscular evaluations only, POST).

Statistical analysis

Power assessment for the primary outcome (VATMS) was based on a minimum expected NO precursors effect of 10%. Assuming an α level of 5% and power of 80%, 15 subjects were required. Statistical analysis were conducted with $n = 15$ for every experiments except for HbO_2, HHb and HbTot concentrations in pre-frontal cortex and ischemia reperfusion test ($n=14$) and quadriceps muscles ($n = 13$) due to technical issues. Data were analyzed with SPSS v.24 software using one-way (supplementation) or two-way (supplementation × time) ANOVA with repeated-measures after establishing that data conformed to a normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test). Least Squares Difference

(LSD) post hoc analyses were performed when a significant ANOVA effect was identified. Partial eta square (pη2) values are reported as measures of effect size, with moderate and large effects considered for pη2 ≥ 0.07 and pη2 ≥ 0.14, respectively (Cohen, 1988). For all statistical analyses, a two-tailed > level of 0.05 was used as the cut off for significance. All data are expressed as means ± standard deviation (SD).

Results

Blood sampling

Results of blood analysis are provided in Table 1. At 65 min following NO precursor intake, there was a significant increase in plasma nitrate concentration in N, N+A, and N+C compared to PLA, P < 0.001, but there were no differences in plasma nitrite concentration. A significant increase in plasma L-arginine concentration was observed in N+A and N+C compared to N and PLA supplementations, P < 0.001. There was a significant increase in plasma L-citrulline concentration in N+C compared to all other supplementations, P < 0.001.

Arginine (µmol.l^{-1})	N	89.1	±	52.0
	N+A	212.9	±	54.2 °,#
	N+C	177.6	±	30.3 °,#,*
	PLA	74.1	±	16.9
Citrulline (µmol.l^{-1})	N	26.9	±	8.4
	N+A	33.9	±	5.0
	N+C	416.1	±	87.9 °,#,*
	PLA	4.9	±	4.9
Nitrite (µmol.l^{-1})	N	83.5	±	20.1
	N+A	76.0	±	19.5
	N+C	70.1	±	18.4
	PLA	74.8	±	19.3
Nitrate (µmol.l^{-1})	N	293.7	±	57.3 #
	N+A	310.2	±	36.3 #
	N+C	284.1	±	99.3 #
	PLA	29.9	±	19.0

Data are presented as mean ± SD, n = 15. N, nitrate, N+A, nitrate + L-arginine, N+C, nitrate + L-citrulline, PLA, placebo. °, significant difference with N supplementation (P < 0.01); #, significant difference with PLA (P < 0.01); *, significant difference with N+A supplementation (P < 0.01)

Table 1. L-arginine, L-citrulline, nitrite and nitrate plasma concentration 65 min after nitric oxide precursors intake

Ischemia-reperfusion test

As shown in Figure 2, Δmax/min HbTot differed significantly between supplementations, F (3.54), P = 0.023, pη2 = 0.214, while there was no significant difference between supplementations for Δmax/min HbO_2, F (1.05), P = 0.383, pη2 = 0.074. Post-hoc analysis showed difference between PLA and N, P = 0.025, and PLA and N+C, P = 0.018, supplementations.

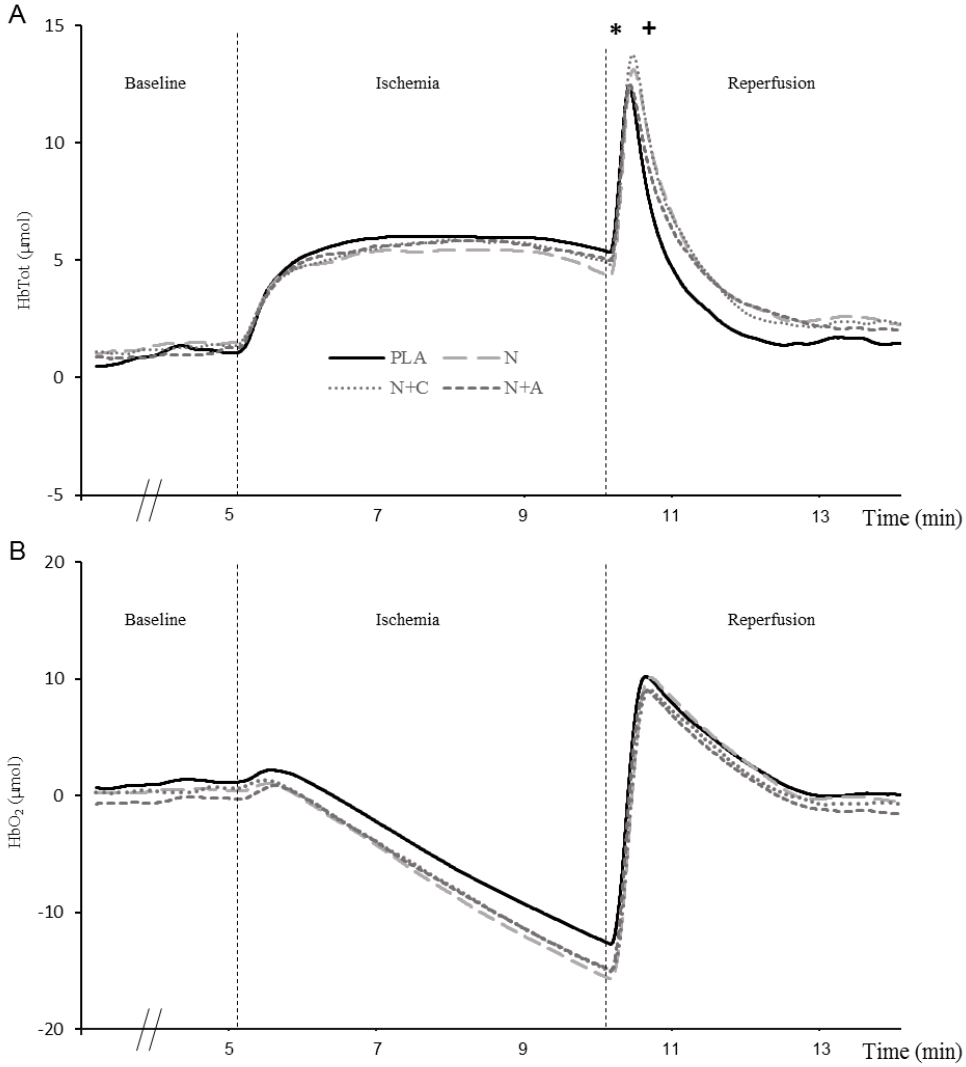


Figure 2. Changes in near-infrared spectroscopy signals during the ischemia-reperfusion test. HbO_2, oxyhemoglobin (panel A); HbTot, total hemoglobin (panel B); N, nitrate; N+A, nitrate + L-arginine; N+C, nitrate + L-citrulline; PLA, placebo; +, significant difference between PLA and N+C supplementations for Δmax/min; *, significant difference between PLA and N supplementations for Δmax/min ($p < 0.05$); n=14.

Blood pressure

Blood pressure before and 1 hour after NO precursor intake did not differ significantly whatever the supplementation, Supplementation × Time Interaction: systolic, F (1.375), P = 0.263, pη2 = 0.089; diastolic, F (1.946), P = 0.137, pη2 = 0.122; mean, F (1.583), P = 0.208, pη2 = 0.102; (Table 2).

		Before			60 min after		
Systolic blood pressure (mmHg)	N	120.0	±	9.3	113.9	±	9.4
	N+A	118.7	±	7.0	114.9	±	9.2
	N+C	121.8	±	9.3	113.3	±	8.1
	PLA	119.7	±	7.9	114.4	±	8.5
Diastolic blood pressure (mmHg)	N	77.2	±	6.5	76.4	±	7.4
	N+A	74.5	±	8.3	75.5	±	7.4
	N+C	76.0	±	6.7	71.5	±	6.8
	PLA	73.7	±	7.6	74.8	±	6.9
Mean arterial pressure (mmHg)	N	91.8	±	5.5	87.9	±	4.9
	N+A	90.6	±	9.5	88.6	±	6.5
	N+C	91.2	±	6.6	84.9	±	5.4
	PLA	90.7	±	7.0	88.7	±	5.9

Data are presented as mean ± SD, n = 15. N, nitrate, N+A, nitrate + L-arginine, N+C, nitrate + L-citrulline, PLA, placebo; Before, before nitric oxide precursor intake; 60 min after, 60 min after nitric oxide precursor intake.

Table 2. Systolic, diastolic and mean arterial pressure before and 60 min after nitric oxide precursors intake.

Pre-frontal cortex and quadriceps oxygenation

There was no significant difference between supplementations for pre-frontal cortex HbO_2, Supplementation × Time Interaction, F (1.63), P = 0.186, pη2 = 0.104, HHb, Supplementation × Time Interaction, F (0.45), P = 0.846, pη2 = 0.0.031, and HbTot, Supplementation × Time Interaction, F (1.18), P = 0.331, pη2 = 0.078, concentrations during the knee extension exercise (Figure 3 A, C and E). Similarly, there was no significant difference between supplementations for quadriceps HbO_2, Supplementation × Time Interaction, F (0.28), P = 0.945, pη2 = 0.020, HHb, Supplementation × Time Interaction, F (0.51), P = 0.796, pη2 = 0.035, and HbTot, Supplementation × Time Interaction, F (1.18), P = 0.331, pη2 = 0.078, concentrations during the knee extension exercise (Figure 3 B, D and F).

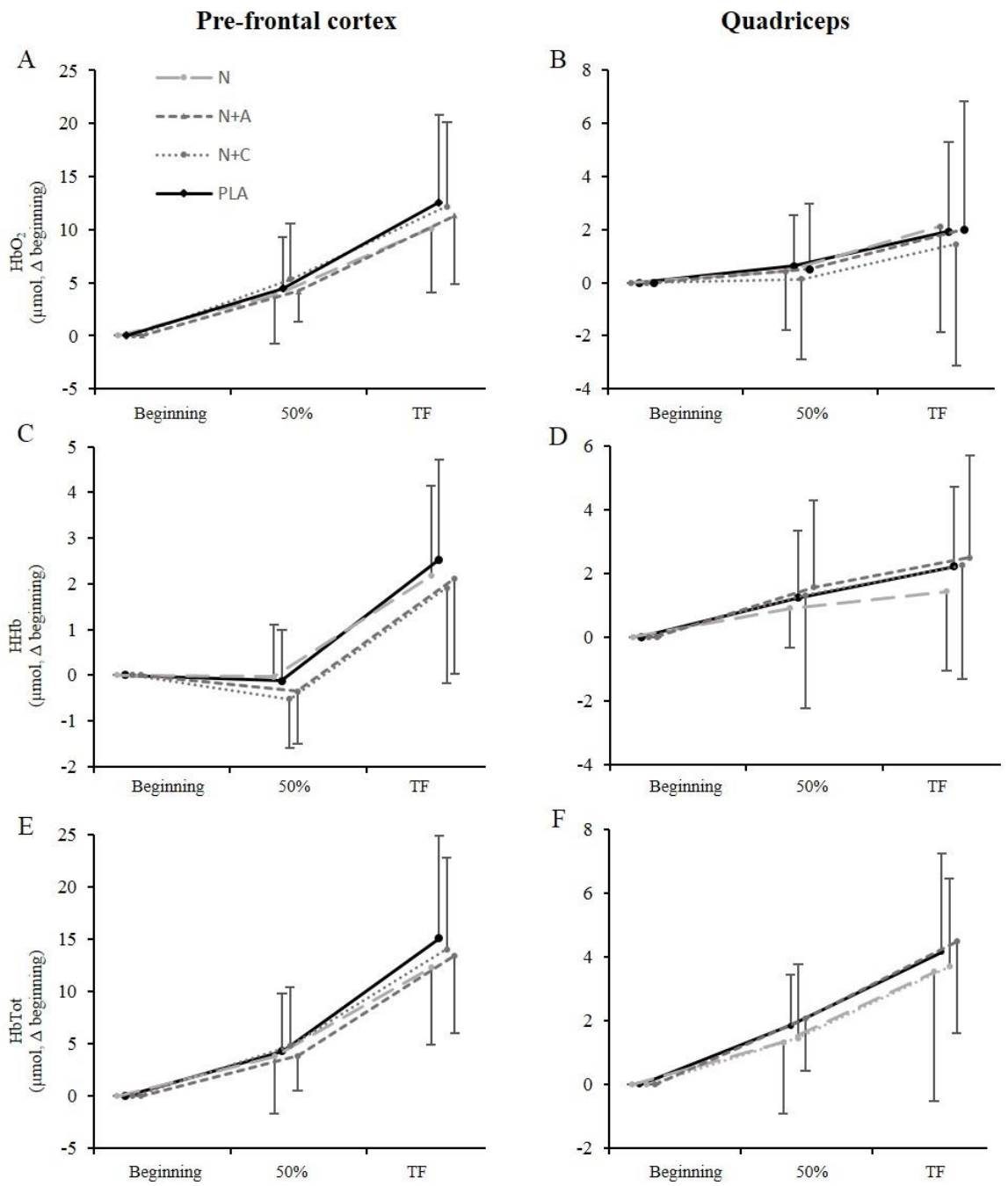


Figure 3. Changes in near-infrared spectroscopy signals during the knee extension exercise test. HbO_2, oxyhemoglobin (panels A and B); HHb, deoxyhemoglobin (panels C and D); HbTot, total hemoglobin (panels E and F); N, nitrate; N+A, nitrate + L-arginine; N+C, nitrate + L-citrulline; PLA, placebo; Beginning, first 30 s of knee extension exercise; 50%, 50% of the duration of the shortest test (*i.e.* isotime); TF, task failure. Pre-frontal cortex n = 14, quadriceps n = 13.

Neuromuscular fatigue

Exercise-induced MVC changes were not significantly different between supplementations, Supplementation × Time Interaction, F (0.70), P = 0.706, pη2 = 0.048; Figure 4A. Similarly, changes in Tw and Mmax during exercise did not differ between supplementations, Supplementation × Time Interaction: Tw, F (1.80), P = 0.156, pη2 = 0.114; Mmax, F (0.62), P = 0.636, pη2 = 0.043; Figure 4B and Table 3.

VAFNES and VATMS during exercise were similar whatever the supplementation, Supplementation × Time Interaction, F (1.10), P = 0.368, pη2 = 0.073 and F (0.52), P = 0.674, pη2 = 0.036, respectively; Figure 5A and B.

No significant difference between supplementations was observed for MEP·Mmax^{-1} at 45% MVC, Supplementation × Time Interaction, MEP45·Mmax^{-1}, F (0.67), P = 0.599, pη2 = 0.046, (Table 3) and 100% MVC, Supplementation × Time Interaction, MEP100·Mmax^{-1}, F (0.71), P = 0.583, pη2 = 0.048, (Table 3). There was no significant difference between supplementations in SP at 45% and 100% MVC, Supplementation × Time Interaction, 45% MVC, F (1.33); P = 0.253, pη2 = 0.087, 100% MVC, F (0.37), P = 0.898, pη2 = 0.025, (Table 3). Similarly, no difference between supplementations was observed for RMSMVC·Mmax^{-1}, Supplementation × Time Interaction, F (0.85), P = 0.461, pη2 = 0.057, (Table 3).

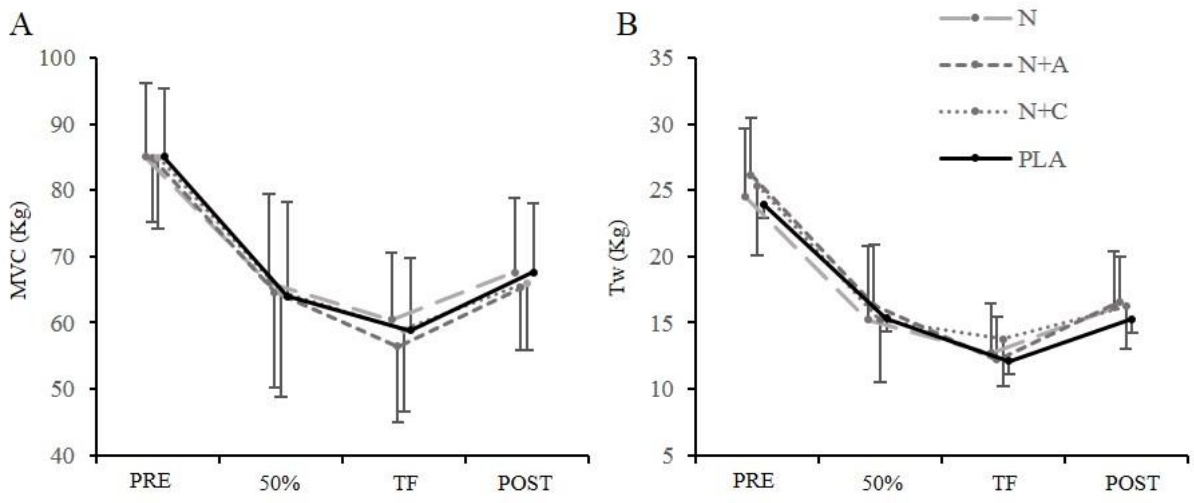


Figure 4. Knee extension peak force during the isometric knee extension test. MVC, maximum voluntary contraction (panel A); Tw, response to femoral nerve electrical stimulation (panel B); N, nitrate; N+A, nitrate + L-arginine; N+C, nitrate + L-citrulline; PLA, placebo; PRE, before exercise, 50 %, 50% of the duration of the shortest test (*i.e.* isotime), TF, first set of contraction after task failure, POST, mean of the 3 sets of contraction after task failure; n=15.

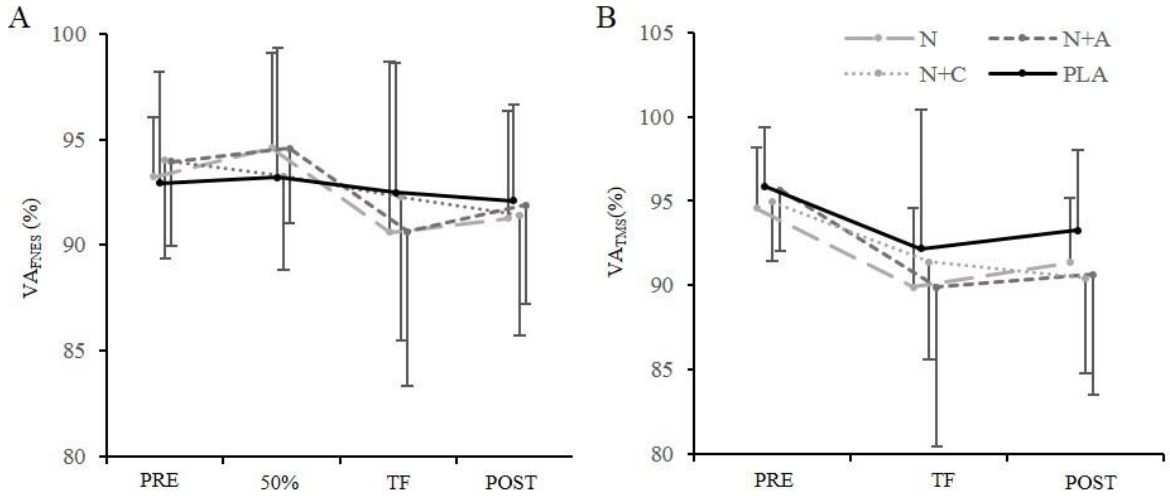


Figure 5. Voluntary activation during the isometric knee extension test. $VA_{FNES,}$ Voluntary activation measured by femoral nerve electrical stimulation (panel A); $VA_{TMS,}$ Voluntary activation measured by transcranial magnetic stimulation (panel B); N, nitrate; N+A, nitrate + L-arginine; N+C, nitrate + L-citrulline; PLA, placebo; PRE, before exercise, 50 %, 50% of the duration of the shortest test (*i.e.* isotime), TF, first set of contraction after task failure, POST, mean of the 3 sets of contraction after task failure; n=15.

		PRE	50%	Task failure	POST
M_{max} (mV)	N	11.6 ± 2.9	10.9 ± 3.5	11.0 ± 3.2	11.2 ± 3.0
	N+A	11.5 ± 2.9	11.4 ± 3.1	11.3 ± 3.5	11.4 ± 3.3
	N+C	11.8 ± 2.9	11.5 ± 3.2	11.4 ± 3.1	11.4 ± 3.0
	PLA	11.0 ± 3.1	10.4 ± 3.4	10.4 ± 3.7	10.5 ± 3.2
$MEP_{45} \cdot M_{max}^{-1}$	N	52.1 ± 12.6	58.2 ± 15.2	51.3 ± 13.9	51.9 ± 12.3
	N+A	54.6 ± 9.9	62.4 ± 12.2	52.9 ± 13.5	52.8 ± 7.5
	N+C	56.3 ± 14.5	63.7 ± 13.8	59.6 ± 16.8	58.6 ± 16.5
	PLA	58.8 ± 14.8	68.4 ± 21.4	63.8 ± 23.1	60.5 ± 11.7
$MEP_{100} \cdot M_{max}^{-1}$	N	47.9 ± 12.1	46.2 ± 15.8	43.4 ± 14.6	46.7 ± 11.5
	N+A	45.6 ± 10.7	45.1 ± 14.2	44.6 ± 10.2	46.1 ± 10.0
	N+C	50.5 ± 11.7	47.0 ± 13.5	44.4 ± 10.8	46.6 ± 11.8
	PLA	51.0 ± 11.0	54.7 ± 16.1	50.3 ± 15.8	50.7 ± 10.6
$RMS_{MVC} \cdot M_{max}^{-1} \cdot 10^3$	N	59.4 ± 9.7	73.2 ± 19.9	58.1 ± 28.4	62.6 ± 19.3
	N+A	58.6 ± 15.2	59.9 ± 13.5	58.0 ± 17.7	61.8 ± 15.1
	N+C	60.7 ± 11.8	73.2 ± 31.2	70.9 ± 27.5	72.8 ± 22.7
	PLA	69.0 ± 37.7	80.9 ± 53.9	74.2 ± 26.2	75.4 ± 23.4
SP_{45} (ms)	N	0.109 ± 0.01	0.139 ± 0.04		0.119 ± 0.03
	N+A	0.112 ± 0.01	0.137 ± 0.03		0.116 ± 0.01
	N+C	0.109 ± 0.01	0.139 ± 0.04		0.114 ± 0.01
	PLA	0.111 ± 0.01	0.126 ± 0.03		0.118 ± 0.02
SP_{100} (ms)	N	0.096 ± 0.00	0.146 ± 0.07		0.114 ± 0.03
	N+A	0.097 ± 0.01	0.142 ± 0.05		0.117 ± 0.03
	N+C	0.099 ± 0.01	0.150 ± 0.06		0.112 ± 0.02
	PLA	0.099 ± 0.01	0.140 ± 0.04		0.110 ± 0.02

Data are presented as mean ± SD, n = 15. N, nitrate, N+A, nitrate + L-arginine, N+C, nitrate + L-citrulline, PLA, placebo; PRE, before exercise; 50 %, 50% of the duration of the shortest test; task failure, first set of contraction after Task failure; POST, mean of the 3 sets of contraction after task failure; M_{max}, Maximal M-wave; $MEP_{45} \cdot M_{max}^{-1}$, motor evoked potential normalized to M_{max} at 45% MVC; $MEP_{100} \cdot M_{max}^{-1}$, motor evoked potential normalized to $M_{max\ at}$ MVC; $RMS_{MVC} M_{max}^{-1} \cdot 10^3$, mean EMG root mean square normalized at MVC; SP_{45}, silent period duration at 45% MVC; SP_{100}, silent period duration at MVC.

Table 3. EMG parameters measured before, during and after the quadriceps exercise test.

Knee extension exercise performance

The total number of contractions to task failure during the knee extension exercise test was not significantly different during N, N+A, N+C supplementations compared to PLA, N 71.9 ± 33.2; N+A 73.3 ± 39.4; N+C 74.6 ± 34.0; PLA 71.8 ± 39.9; $P > 0.05$.

Discussion

This is the first study to evaluate the effects of acute NO precursors on peripheral and central mechanisms of exercise-induced neuromuscular fatigue. The main results are that acute NO precursor ingestion i) increased plasma concentration of NO precursors [nitrate, L-arginine (N+A and N+C) and L-citrulline (N+C)], ii) enhanced post-ischemic vasodilation, iii) had no significant effect on muscle and cerebral oxygenation, iv) had no significant effect on peripheral and central mechanisms of neuromuscular fatigue and v) did not improve exercise performances. Taken together, our findings suggest that increasing acutely NO bioavailability may improve post-ischemia endothelial function in the muscle microcirculation at rest, but has no significant effect on muscle and cerebral oxygenation during exercise and on muscle contractility, voluntary activation and finally exercise performances in healthy young subjects.

Blood analysis

The acute intake of beetroot extract containing 8.3 mmol of nitrate increased significantly plasma nitrate concentration compared to placebo. These finding are consistent with those observed in a pharmacodynamic study after the ingestion of similar dose of concentrated nitrate-rich beetroot juice (James et al., 2015). As expected, blood plasma L-citrulline concentration increased by almost 20 fold after N+C ingestion compared to the three other supplementations which is comparable to previous observations (Moinard et al., 2008). Also as expected, plasma L-arginine concentration was significantly greater in N+C and N+A compared to N and PLA supplementations. Considering previous reports on plasma nitrate and nitrite kinetic after nitrate supplementation (Webb et al., 2008) and plasma L-arginine kinetics after L-arginine and L-citrulline supplementation (Moinard et al., 2008), the earlier blood sampling after supplement ingestion in the present compared to previous studies may explain the unchanged plasma nitrite concentration and lower plasma L-arginine concentration in N+C compared to N+A. Blood samples were drawn 65 min after ingestion of the NO precursors in the present study since later blood sampling would have interfered with the neuromuscular assessments. Later blood sampling may have shown a slightly different picture regarding plasma nitrite and L-arginine concentrations, *i.e.* larger nitrite concentration in N, N+A, N+C *versus* PLA and larger L-arginine in N+C *versus* N+A. We believe however that the present results support an increased plasma NO bioavailability induced by the three supplementations.

Ischemia-reperfusion and blood pressure

During the post-ischemia reperfusion phase, Δmax/min HbTot was significantly larger after both N+C and N supplementation compared to placebo. Post-ischemia reperfusion is known to

reflect mostly NO-dependent vasodilator mechanisms (Green et al., 2014). Hence, this result suggests an improved NO-dependent flow-mediated vasodilation after NO precursor ingestion. Previous studies have shown an improvement in flow-mediated dilation assessed by Doppler ultrasound measurements following both acute and chronic intake of various amounts of nitrate in healthy subjects (Heiss et al., 2012; Rodriguez-Mateos et al., 2015). By using NIRS in healthy subjects, Kold et al. (2017) showed that oral administration of sodium nitrate (491 mg of nitrate) increased post-ischemic HbTot response in the thenar eminence while we showed in the quadriceps muscle a larger post-ischemia hyperaemic response after acute nitrate (520 mg) and L-citrulline (6 g) ingestion (Le Roux-Mallouf et al., 2017). In the present study, nitrate alone and nitrate plus L-citrulline intake showed similar positive effects on post-ischemic vasodilation assessed by NIRS. Taken together, these changes observed by NIRS and Doppler ultrasound following NO precursor intake show the positive effect in healthy subjects of increasing NO bioavailability on vascular function. The fact that N+C supplementation (and N+A, although not significantly, figure 2) but also N alone showed a significant effects on post-ischemic NO dependent vasodilation suggests that the increase of NO bioavailability in this condition may be primarily due to the nitrate-nitrite-NO pathway. Since this pathway contributes to NO production especially under hypoxic conditions (Lundberg et al., 2008), ischemic conditions may be particularly prone to show the positive effect of nitrate supplementation.

Results from a meta-analysis (Siervo et al., 2013) showed that in healthy subjects, acute, short term and chronic inorganic nitrate supplementation induces a 4.4 mmHg mean reduction in systolic blood pressure. Similar to the present one however, several studies, especially including healthy young adults, reported no effect of NO precursor supplementation on resting blood pressure (Larsen et al., 2006; Kim et al., 2015; Wightman et al., 2015; Le Roux-Mallouf et al., 2017). There are several possible explanations for these contrasting results. Firstly, the ability to detect relatively small effect of acute NO precursor ingestion on blood pressure may be limited by between-days physiological and technical variability in a relatively small sample of healthy subjects. Secondly, the present study has assessed the effect of a relatively low dose of nitrate (*i.e.* 8.5 mmol) compared to previous studies which reported a significant effect on blood pressure (Siervo et al., 2013). At last, chronic NO precursor supplementation may be more prone to reduce blood pressure than acute supplementation in healthy subjects.

Cerebral and muscle oxygenation

As expected, both cerebral and muscle oxygenation increased during local knee extension exercise test, but this response was unchanged by NO precursor ingestion. Hence, despite its positive effect on resting post-ischemia reperfusion, increasing NO bioavailability does not appear to have a positive effect on cerebral and muscular hemodynamic responses to exercise. Few studies reported the effects of acute L-arginine and/or L-citrulline supplementation on muscle perfusion with contrasting results. Alvares et al. (2012) showed that acute L-arginine supplementation (6 g) increased muscle blood volume during recovery between sets of resistance exercise. Conversely, three other studies showed no muscle hemodynamic change during exercise after 10 g and 7 g of L-arginine supplementation (Robinson et al., 2003; Fahs et al., 2009; Tang et al., 2011). Taken together, these results suggest that acute L-arginine or L-citrulline supplementation does not seem to have positive effect on exercise muscle perfusion in healthy subjects without endothelial dysfunction. Regarding NOS-independent pathway, Richards et al. (2018) have shown that acute beetroot juice consumption increased human muscle blood flow during moderate-to high-intensity handgrip exercise via local vasodilation. Previous studies (Kim et al., 2015; Bentley et al., 2017; Craig et al., 2018) measuring muscle oxygenation by NIRS in healthy humans during local exercise have not found a positive effect of acute nitrate supplementation. There are several observations that merit discussion. Firstly, a study performed in the rat hind limb during treadmill exercise indicates that the improvement in muscle perfusion after beetroot juice intake predominantly occurred in fast twitch muscle fibers (Ferguson et al., 2013). Such a muscle fiber type-specific effect of nitrate intake may underlie the lack of effect of nitrate supplementation in the present study using moderate exercise intensity probably recruiting predominantly slow twitch fibers. Secondly, it has been shown that the rate of NOS-independent NO production increases as oxygen saturation falls, suggesting a hypoxia-regulated mechanism of nitrite bioactivation (Lundberg et al., 2008; van Faassen et al., 2009). While hypoxia during the ischemia-reperfusion test may have promoted increased NO production from nitrite following nitrate intake, during the knee extension test NIRS signals showed that muscle and cerebral oxygenation increased progressively. Other exercise modality (e.g. cycling exercise) may be more prone to induce tissue hypoxia and therefore nitrite reduction to NO. Thirdly, HbTot measured by NIRS is an indirect, semi-quantitative measure of blood flow and further studies on the effect of NO precursors on tissue perfusion are required.

Regarding cerebral perfusion, using functional magnetic resonance imaging, Presley et al. (2011) found that 2-days of high nitrate diet (12.4 mmol/day) selectively improved resting

regional white matter perfusion (dorsolateral prefrontal cortex only) in elderly humans. In agreement with these findings, Fan et al. (2018) found that short-term dietary nitrate (~12.4 mmol) supplementation moderately elevated prefrontal HbO_2 and HbTot during high intensity cycling exercise while Wightman et al. (2015) found that acute dietary nitrate ingestion (~5.5 mmol) enhanced prefrontal NIRS response during cognitive tasks. Conversely, similar responses in cerebral NIRS signal during hypoxic exercise were observed following nitrate and placebo ingestion (Masschelein et al., 2012). To the best of our knowledge, no study has examined the effect of L-arginine or L-citrulline supplementation on cerebral perfusion and oxygenation during exercise. In our study, cerebral HbO_2 and HbTot increased similarly with all supplementations from rest to exhaustion. To clarify these contrasting results, further studies on cerebral perfusion/oxygenation changes due to NO precursor ingestion should consider the influence of the exercise modality (e.g. isolated *versus* whole body exercise) and potential differences between brain regions.

Finally, the lack of effect on muscle and cerebral oxygenation could be explained by the initial participant's vascular function. Some studies suggest that NO precursor effects depend on basal NO bioavailability which can be influenced by endothelial NOS activity (Li et al., 2015), nutritional habits (d'El-Rei et al., 2016) and the training level (Wilkerson et al., 2012; Boorsma et al., 2014). Participants in the present study were 18 to 30 years old, had no cardiovascular risk factor and were moderately trained. Hence, muscle and cerebral vasodilation might have been already optimal in this population. The increase in NO bioavailability may play a more significant role to improve vasodilation when perfusion pressure impairment (such as in older individuals and in patients with cardiovascular dysfunctions) compromises exercising muscle or cerebral blood flow and oxygenation (Casey et al., 2015).

Peripheral and central mechanisms of neuromuscular fatigue

We hypothesized that acute NO precursor intake would improve muscle and cerebral oxygenation and delay the reduction in muscle contractility and voluntary activation during exercise. The lack of effect of NO precursors on muscle and cerebral oxygenation during knee extensions may explain the absence of effect on peripheral and central mechanisms of neuromuscular fatigue. Only one study has assessed the effect of NO precursor intake on peripheral fatigue kinetic during electrically evoked knee extensions (Hoon et al., 2015). This study showed that nitrate intake attenuated muscular fatigue during evoked contractions under hypovolemic condition only. NO has been shown to influence muscle contraction and relaxation (Reid, 1998) through the alteration of Ca2+ release and uptake by the sarcoplasmic

reticulum (Zahradníková et al., 1997; Viner et al., 2000) and improvement in phosphocreatine resynthesis (Bailey et al., 2010). Despite these effects of NO on muscle contractility and metabolism, the present results suggest that increasing NO bioavailability does not prevent the development of muscle fatigue during isometric knee extensions in young healthy humans. This result should be confirmed during other exercise modalities such as whole body exercise inducing larger cardiovascular stress or during high-intensity muscles contractions (Domínguez et al., 2018). NO precursor intake had no effect on voluntary activation neither. We hypothesized that acute NO precursor intake would improve neurovascular response to exercise and consequently delay the reduction in voluntary activation (*i.e.* central fatigue) during exercise. Wightman et al. (2015) showed for instance that acute dietary nitrate ingestion improved cognitive performance in healthy humans suggesting a significant effect of NO precursor on cerebral function. This effect was associated with significant changes in NIRS signal response which is in contrast with the present results. Hence, the lack of NO precursor effect on cerebral oxygenation could explain the absence of NO precursor effect on voluntary activation during exercise. Altogether, the absence of effect of NO precursors on cerebral and muscle oxygenation and fatigue is consistent with the similar exercise performance levels (*i.e.* maximal muscle strength and endurance) observed whatever the supplementation tested. This emphasizes the potential role of exercise modality and subject characteristics regarding the ergogenic effect of NO precursors as underlined recently (Jones et al., 2018).

Conclusion

The present study shows that nitrate alone or together with L-citrulline or L-arginine significantly increased the lower-limb post-ischemic microvascular reactivity as assessed by NIRS in healthy subjects. However, NO precursors had no effect on muscle and cerebral oxygenation nor on peripheral and central mechanisms of neuromuscular fatigue during isometric knee extensions. Hence, as opposed to the post-ischemic hyperaemic response, NO bioavailability may not be the limiting factor for tissue perfusion and oxygenation during this kind of exercise, at least in healthy young subjects without cardiovascular dysfunction.

Acknowledgment. We thank all the subjects for participating in the study as well as the staff of the Sport and Pathologies Unit of the Grenoble Alpes Hospital for technical assistance.

Conflicts of interest. The authors report no conflicts of interest associated with this manuscript.

Funding. This work was funded by Fitness-Boutique©.

References

Aamand R, Dalsgaard T, Ho Y-CL, Møller A, Roepstorff A & Lund TE (2013). A NO way to BOLD? Dietary nitrate alters the hemodynamic response to visual stimulation. NeuroImage 83, 397–407.

Alvares TS, Conte CA, Paschoalin VMF, Silva JT, Meirelles C de M, Bhambhani YN & Gomes PSC (2012). Acute L-arginine supplementation increases muscle blood volume but not strength performance. Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab 37, 115–126.

Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA & Newman EA (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. Nature 468, 232–243.

Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A, Winyard PG, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Benjamin N & Jones AM (2010). Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 109, 135–148.

Bentley RF, Walsh JJ, Drouin PJ, Velickovic A, Kitner SJ, Fenuta AM & Tschakovsky ME (2017). Dietary nitrate restores compensatory vasodilation and exercise capacity in response to a compromise in oxygen delivery in the noncompensator phenotype. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 123, 594–605.

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.

Casey DP, Treichler DP, Ganger CT, Schneider AC & Ueda K (2015). Acute dietary nitrate supplementation enhances compensatory vasodilation during hypoxic exercise in older adults. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 118, 178–186.

Casey DP, Walker BG, Ranadive SM, Taylor JL & Joyner MJ (2013). Contribution of nitric oxide in the contraction-induced rapid vasodilation in young and older adults. J Appl Physiol 115, 446–455.

Chin-Dusting JPF, Willems L & Kaye DM (2007). L-arginine transporters in cardiovascular disease: a novel therapeutic target. Pharmacol Ther 116, 428–436.

Cohen J (1988). Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Available at: https://www.elsevier.com/books/statistical-power-analysis-for-the-behavioral-sciences/cohen/978-0-12-179060-8 [Accessed September 16, 2018].

Craig JC, Broxterman RM, Smith JR, Allen JD & Barstow TJ (2018). Effect of dietary nitrate supplementation on conduit artery blood flow, muscle oxygenation, and metabolic rate during handgrip exercise. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 125, 254–262.

Damron LA, Dearth DJ, Hoffman RL & Clark BC (2008). Quantification of the corticospinal silent period evoked via transcranial magnetic stimulation. J Neurosci Methods 173, 121–128.

Dawson TM & Snyder SH (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. J Neurosci Off J Soc Neurosci 14, 5147–5159.

Domínguez R, Maté-Muñoz JL, Cuenca E, García-Fernández P, Mata-Ordoñez F, Lozano-Estevan MC, Veiga-Herreros P, da Silva SF & Garnacho-Castaño MV (2018). Effects of

beetroot juice supplementation on intermittent high-intensity exercise efforts. J Int Soc Sports Nutr 15, 2.

van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin AF, Weitzberg E, Zweier J & Gladwin MT (2009). Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. Med Res Rev 29, 683–741.

Fahs CA, Heffernan KS & Fernhall B (2009). Hemodynamic and vascular response to resistance exercise with L-arginine. Med Sci Sports Exerc 41, 773–779.

Fan J-L, Bourdillon N, Meyer P & Kayser B (2018). Oral Nitrate Supplementation Differentially Modulates Cerebral Artery Blood Velocity and Prefrontal Tissue Oxygenation During 15 km Time-Trial Cycling in Normoxia but Not in Hypoxia. Front Physiol; DOI: 10.3389/fphys.2018.00869.

Ferguson SK, Hirai DM, Copp SW, Holdsworth CT, Allen JD, Jones AM, Musch TI & Poole DC (2013). Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. J Physiol 591, 547–557.

Figueroa A, Wong A, Jaime SJ & Gonzales JU (2017). Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 20, 92–98.

Gandevia SC (2001). Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. Physiol Rev 81, 1725–1789.

Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J & Pattinson KTS (2015). The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. Exp Neurol 263, 235–243.

Gilligan DM, Panza JA, Kilcoyne CM, Waclawiw MA, Casino PR & Quyyumi AA (1994). Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. Circulation 90, 2853–2858.

Goodall S, Romer LM & Ross EZ (2009). Voluntary activation of human knee extensors measured using transcranial magnetic stimulation. Exp Physiol 94, 995–1004.

Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HMM, Jones H & Thijssen DHJ (2014). Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. Hypertens Dallas Tex 1979 63, 376–382.

Gruet M, Temesi J, Rupp T, Levy P, Millet GY & Verges S (2013). Stimulation of the motor cortex and corticospinal tract to assess human muscle fatigue. Neuroscience 231, 384–399.

Haider G & Folland JP (2014). Nitrate supplementation enhances the contractile properties of human skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc 46, 2234–2243.

Heiss C, Meyer C, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Heinen Y, Luedike P, Keymel S, Ayoub N, Lundberg JO, Weitzberg E, Kelm M & Rassaf T (2012). Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. Free Radic Biol Med 52, 1767–1772.

Hermens HJ, Freriks B, Disselhorst-Klug C & Rau G (2000). Development of recommendations for SEMG sensors and sensor placement procedures. J Electromyogr Kinesiol Off J Int Soc Electrophysiol Kinesiol 10, 361–374.

Hernández A, Schiffer TA, Ivarsson N, Cheng AJ, Bruton JD, Lundberg JO, Weitzberg E & Westerblad H (2012). Dietary nitrate increases tetanic [Ca2+]i and contractile force in mouse fast-twitch muscle. J Physiol 590, 3575–3583.

Hirst DG & Robson T (2011). Nitric oxide physiology and pathology. Methods Mol Biol Clifton NJ 704, 1–13.

Hoon MW, Fornusek C, Chapman PG & Johnson NA (2015). The effect of nitrate supplementation on muscle contraction in healthy adults. Eur J Sport Sci 15, 712–719.

James PE, Willis GR, Allen JD, Winyard PG & Jones AM (2015). Nitrate pharmacokinetics: Taking note of the difference. Nitric Oxide Biol Chem 48, 44–50.

Jones AM, Thompson C, Wylie LJ & Vanhatalo A (2018). Dietary Nitrate and Physical Performance. Annu Rev Nutr 38, 303–328.

Kim J-K, Moore DJ, Maurer DG, Kim-Shapiro DB, Basu S, Flanagan MP, Skulas-Ray AC, Kris-Etherton P & Proctor DN (2015). Acute dietary nitrate supplementation does not augment submaximal forearm exercise hyperemia in healthy young men. Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab 40, 122–128.

Kolb L, Orbegozo D, Creteur J, Preiser J-C, Vincent J-L & De Backer D (2017). Oral Nitrate Increases Microvascular Reactivity and the Number of Visible Perfused Microvessels in Healthy Volunteers. J Vasc Res 54, 209–216.

Kuhn KP (2002). Oral L-citrulline effectively elevates plasma L-arginine levels for 24 hours in normal volunteers. Circulation 106, II1-766S.

Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO & Weitzberg E (2006). Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. N Engl J Med 355, 2792–2793.

Le Roux-Mallouf T, Vibert F, Doutreleau S & Verges S (2017). Effect of acute nitrate and L-citrulline supplementation on muscle microvascular response to ischemia-reperfusion in healthy humans. Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab1–8.

Lévénez M, Garland SJ, Klass M & Duchateau J (2008). Cortical and spinal modulation of antagonist coactivation during a submaximal fatiguing contraction in humans. J Neurophysiol 99, 554–563.

Li Q, Youn J-Y & Cai H (2015). Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. J Hypertens 33, 1128–1136.

Lundberg JO & Govoni M (2004). Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. Free Radic Biol Med 37, 395–400.

Lundberg JO & Weitzberg E (2009). NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. Arch Pharm Res 32, 1119–1126.

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

Masschelein E, Van Thienen R, Wang X, Van Schepdael A, Thomis M & Hespel P (2012). Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 113, 736–745.

Mathis J, de Quervain D & Hess C. (1998). Dependence of the transcranially induced silent period on the `instruction set' and the individual reaction time. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Mot Control 109, 426–435.

McLay KM, Fontana FY, Nederveen JP, Guida FF, Paterson DH, Pogliaghi S & Murias JM (2016a). Vascular responsiveness determined by near-infrared spectroscopy measures of oxygen saturation. Exp Physiol 101, 34–40.

McLay KM, Nederveen JP, Pogliaghi S, Paterson DH & Murias JM (2016b). Repeatability of vascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy. Physiol Rep; DOI: 10.14814/phy2.12772.

McMahon NF, Leveritt MD & Pavey TG (2017). The Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Endurance Exercise Performance in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sports Med Auckl NZ 47, 735–756.

Merton PA (1954). Voluntary strength and fatigue. J Physiol 123, 553–564.

Miles AM, Wink DA, Cook JC & Grisham MB (1996). Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. Methods Enzymol 268, 105–120.

Millet GY, Martin V, Martin A & Vergès S (2011). Electrical stimulation for testing neuromuscular function: from sport to pathology. Eur J Appl Physiol 111, 2489–2500.

Moinard C, Nicolis I, Neveux N, Darquy S, Bénazeth S & Cynober L (2008). Dose-ranging effects of L-citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. Br J Nutr 99, 855–862.

Perrey S & Ferrari M (2017). Muscle Oximetry in Sports Science: A Systematic Review. Sports Med Auckl NZ; DOI: 10.1007/s40279-017-0820-1.

Presley TD, Morgan AR, Bechtold E, Clodfelter W, Dove RW, Jennings JM, Kraft RA, King SB, Laurienti PJ, Rejeski WJ, Burdette JH, Kim-Shapiro DB & Miller GD (2011). Acute effect of a high nitrate diet on brain perfusion in older adults. Nitric Oxide Biol Chem 24, 34–42.

d'El-Rei J, Cunha AR, Trindade M & Neves MF (2016). Beneficial Effects of Dietary Nitrate on Endothelial Function and Blood Pressure Levels. Int J Hypertens; DOI: 10.1155/2016/6791519.

Reid MB (1998). Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. Acta Physiol Scand 162, 401–409.

Richards JC, Racine ML, Hearon CM, Kunkel M, Luckasen GJ, Larson DG, Allen JD & Dinenno FA (2018). Acute ingestion of dietary nitrate increases muscle blood flow via local vasodilation during handgrip exercise in young adults. Physiol Rep; DOI: 10.14814/phy2.13572.

Robinson TM, Sewell DA & Greenhaff PL (2003). L-arginine ingestion after rest and exercise: effects on glucose disposal. Med Sci Sports Exerc 35, 1309–1315.

Rodriguez-Mateos A, Hezel M, Aydin H, Kelm M, Lundberg JO, Weitzberg E, Spencer JPE & Heiss C (2015). Interactions between cocoa flavanols and inorganic nitrate: additive effects on endothelial function at achievable dietary amounts. Free Radic Biol Med 80, 121–128.

Rothwell JC, Thompson PD, Day BL, Boyd S & Marsden CD (1991). Stimulation of the human motor cortex through the scalp. Exp Physiol 76, 159–200.

Rupp T, Jubeau M, Wuyam B, Perrey S, Levy P, Millet GY & Verges S (2012). Time-dependent effect of acute hypoxia on corticospinal excitability in healthy humans. J Neurophysiol 108, 1270–1277.

Rupp T, Mallouf TLR, Perrey S, Wuyam B, Millet GY & Verges S (2015). CO2 Clamping, Peripheral and Central Fatigue during Hypoxic Knee Extensions in Men. Med Sci Sports Exerc 47, 2513–2524.

Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F & Böger RH (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. Br J Clin Pharmacol 65, 51–59.

Sidhu SK, Bentley DJ & Carroll TJ (2009). Cortical voluntary activation of the human knee extensors can be reliably estimated using transcranial magnetic stimulation. Muscle Nerve 39, 186–196.

Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I & Mathers JC (2013). Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. J Nutr 143, 818–826.

Tang JE, Lysecki PJ, Manolakos JJ, MacDonald MJ, Tarnopolsky MA & Phillips SM (2011). Bolus L-arginine supplementation affects neither muscle blood flow nor muscle protein synthesis in young men at rest or after resistance exercise. J Nutr 141, 195–200.

Temesi J, Rupp T, Martin V, Arnal PJ, FéAsson L, Verges S & Millet GY (2014). Central Fatigue Assessed by Transcranial Magnetic Stimulation in Ultratrail Running: Med Sci Sports Exerc 46, 1166–1175.

Todd G, Taylor JL & Gandevia SC (2003). Measurement of voluntary activation of fresh and fatigued human muscles using transcranial magnetic stimulation. J Physiol 551, 661–671.

Viner RI, Williams TD & Schöneich C (2000). Nitric oxide-dependent modification of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase: localization of cysteine target sites. Free Radic Biol Med 29, 489–496.

Waugh WH, Daeschner CW, Files BA, McConnell ME & Strandjord SE (2001). Oral L-citrulline as L-arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. J Natl Med Assoc 93, 363–371.

Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, Rashid R, Miall P, Deanfield J, Benjamin N, MacAllister R, Hobbs AJ & Ahluwalia A (2008). Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertens Dallas Tex 1979 51, 784–790.

White RP, Vallance P & Markus HS (2000). Effect of inhibition of nitric oxide synthase on dynamic cerebral autoregulation in humans. Clin Sci Lond Engl 1979 99, 555–560.

Whitfield J, Gamu D, Heigenhauser G, Loon L, Spriet L, Russell Tupling A & P Holloway G (2017). Beetroot Juice Increases Human Muscle Force Without Changing Ca2+-handling Proteins.

Wightman EL, Haskell-Ramsay CF, Thompson KG, Blackwell JR, Winyard PG, Forster J, Jones AM & Kennedy DO (2015). Dietary nitrate modulates cerebral blood flow parameters and cognitive performance in humans: A double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. Physiol Behav 149, 149–158.

Wijnands KAP, Vink H, Briedé JJ, van Faassen EE, Lamers WH, Buurman WA & Poeze M (2012). L-citrulline a more suitable substrate than L-arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. PloS One 7, e37439.

Wilkerson DP, Hayward GM, Bailey SJ, Vanhatalo A, Blackwell JR & Jones AM (2012). Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists. Eur J Appl Physiol 112, 4127–4134.

Wylie LJ, Kelly J, Bailey SJ, Blackwell JR, Skiba PF, Winyard PG, Jeukendrup AE, Vanhatalo A & Jones AM (2013). Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. J Appl Physiol 115, 325–336.

Yavuz HU, Turnagol H & Demirel AH (2014). Pre-exercise L-arginine supplementation increases time to exhaustion in elite male wrestlers. Biol Sport 31, 187–191.

Zahradníková A, Minarovic I, Venema RC & Mészáros LG (1997). Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. Cell Calcium 22, 447–454.

Publication n°3 : Supplémentation chronique chez la personne âgée

Effet d'une supplémentation chronique sur la fonction vasculaire et la performance à l'effort chez la personne âgée en bonne santé

Nous avons pu démontrer que l'augmentation de la biodisponibilité en NO chez le sujet jeune en bonne santé pouvait améliorer la fonction endothéliale au repos, spécifiquement lors d'un test d'ischémie reperfusion. La phase d'ischémie est susceptible à la fois de limiter la synthèse de NO par les NOS et de compenser cette altération par la facilitation de la réduction du nitrite en NO. Ceci suggère un intérêt des précurseurs de NO quand la synthèse de NO basale s'avère insuffisante. La dysfonction endothéliale liée à l'âge est plurifactorielle, et semble pouvoir être en partie expliquée par une moindre synthèse de NO pas les NOS. L'altération de l'activité des NOS peut être la conséquence d'un déficit en BH4, en NADPH ou en oxygène, mais aussi en L-arginine. Ainsi, dans la ***publication 3*****,** nous avons évalué les effets d'une prise chronique de précurseurs de NO sur la fonction vasculaire et la performance à l'exercice chez la personne âgée en bonne santé. Les participants ont consommés quotidiennement pendant 4 semaines un jus de salade contenant 520 mg de nitrate et 6 g de L-citrulline ou un placebo. La pression artérielle, la rigidité artérielle, la fonction endothéliale ainsi que la réponse vasculaire à l'hypercapnie et l'hypoxie nous ont permis d'évaluer la fonction vasculaire. La performance à l'exercice a été évaluée par deux tests d'effort incrémentaux jusqu'à épuisement. Le premier était un effort global effectué sur ergocycle, et le deuxième était un effort local d'extension du quadriceps. Toutes ces mesures étaient effectuées au moins 6 heures après la dernière prise du complément pour se focaliser sur les effets chroniques et limiter la part des effets aigus de la supplémentation.

- Publication n°3 -

Effect of chronic nitrate and citrulline supplementation on vascular function and exercise performance in older individuals

Thibault Le Roux-Mallouf [1], Felix Pelen [1], Angela Vallejo [1], Idir Halimaoui [1], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]

1 HP2 Laboratory INSERM U1042, Grenoble Alpes University, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

2 Sport and Pathologies Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France.

Résumé

Contexte : Les précurseurs de monoxyde d'azote semble augmenter la biodisponibilité en NO et ainsi améliorer la fonction vasculaire et la performance à l'exercice. Cependant, leurs effets sur l'altération de la fonction vasculaire chez la personne âgée restent nuancés. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet d'une supplémentation chronique en précurseurs de NO sur la fonction vasculaire et la performance à l'exercice chez la personne âgée (60-70 ans).

Méthode : Vingt-quatre sujets âgés en bonne santé (12 femmes) ont effectués des évaluations de la fonction vasculaire et deux tests d'effort jusqu'à épuisement (un test d'extension du quadriceps et un test sur ergocycle) avant et après un mois de prise soit d'un placebo (PLA) soit d'un jus de salade enrichie en nitrate (N+C) contenant 520 mg de nitrate et 6 g de citrulline. La pression artérielle (PA), la rigidité artérielle (PWV), la réponse hyperémique post occlusive, et la réponse cardiovasculaire et cérébrovasculaire à l'hypercapnie et l'hypoxie ont été mesurée avant l'exercice. Durant toute la durée des exercices, l'oxygénation cérébrale et musculaire a été mesurée par spectroscopie proche infrarouge (NIRS).

Résultats : La PA (-3.3 mmHg; p=0.047) était diminuée dans le groupe N+C sans modifications des autres paramètres de la fonction vasculaire. La supplémentation en N+C a entrainé une diminution de la fréquence cardiaque et de la consommation d'oxygène sous maximal, et une amélioration de la performance durant le test sur ergocycle (+5.2 %) mais pas sur le test d'extension du quadriceps.

Conclusion : Ces résultats montrent que la supplémentation en précurseurs de NO chez la personne âgée en bonne santé peut réduire la PA et augmenter les performances à l'effort en améliorant les réponses cardio-respiratoires.

Effect of chronic nitrate and citrulline supplementation on vascular function and exercise performance in older individuals

Thibault Le Roux-Mallouf [1], Felix Pelen [1], Angela Vallejo [1], Idir Halimaoui [1], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]

[1] HP2 Laboratory INSERM U1042, Grenoble Alpes University, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

[2] Sport and Pathologies Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France.

Corresponding author:

Dr. Samuel Verges

Laboratoire HP2 (U1042 INSERM), Univ. Grenoble Alpes

UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, Avenue Kimberley, 38 434 Echirolles - France

Tel: +33 4 76 76 68 60 - Fax: +33 4 76 76 89 21 - E-mail: sverges@chu-grenoble.fr

Keys words: Nitric oxide, nitrate, citrulline, exercise, older adults.

- What is the central question of this study?

This study aims to assess the effect of chronic NO precursor supplementation on vascular function, muscle and cerebral oxygenation and performance during both local and whole-body exercise in healthy older adults.

- What is the main finding and its importance?

Chronic NO precursor ingestion reduces brachial arterial pressure, without improving of arterial stiffness, post-ischemic vasodilation, and cardiovascular and cerebrovascular responses to hypoxia and hypercapnia. Performance during cycling but not knee extension exercise was improve, without changes in muscle and cerebral oxygenation.

Abstract

Increase nitric oxide (NO) bioavailability may improve exercise performance and vascular function. It remains unclear whether older adults who experience a decreased NO bioavailability may benefit from chronic NO precursor supplementation. This randomised double-blind trial aims to assess the effect of chronic NO precursor intake on vascular function and exercise performance in older adults (60-70 years old). Twenty-four healthy older adults (12 females) performed vascular function assessment and both local (knee extensions) and whole-body (incremental cycling) exercise tests to exhaustion before and after one month of daily intake of a placebo (PLA) or a nitrate-rich salad and citrulline (N+C, 520mg nitrate and 6g citrulline) drink. Arterial blood pressure (BP) and stiffness, post-ischemic, hypercapnic and hypoxic vascular responses were evaluated. Prefrontal cortex and quadriceps oxygenation was monitored by near-infrared spectroscopy. N+C supplementation reduced mean BP (-3.3mmHg; $p=0.047$) without altering other parameters of vascular function and oxygenation kinetics. N+C supplementation reduced heart rate and oxygen consumption during submaximal cycling and increased maximal power output by 5.2% ($p<0.05$), but had no effect on knee extension exercise performance. These results suggest that chronic NO precursor supplementation in healthy older individuals can reduce resting BP and increase cycling performance by improving cardiorespiratory responses.

Keys words: Nitric oxide, nitrate, citrulline, exercise, older adults.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous signalling molecule involved in a variety of physiological functions throughout the body [1]. The first pathway for NO production is endogenous via the citrulline-arginine-NO pathway requiring the activity of the nitric oxide synthase (NOS) enzymes. The second pathway is partially exogenous since it uses nitrate and nitrite brought by water and food to produce NO based on the simple one-electron reduction of nitrite. Systemic NO bioavailability can be enhanced by NO precursor supplementation such as arginine [2] and nitrate [3]. Interestingly, it has been shown that oral citrulline supplementation increases the circulating [4,5] and tissue [6] arginine concentration more efficiently than an equivalent dose of arginine, suggesting that exogenous citrulline administration might represent an interesting option to increase the amount of arginine to be converted by NOS in NO.

In the peripheral vessels, NO regulates vascular tone by activating soluble guanylate cyclase in the vascular smooth muscle. During physical activity, NO bioavailability is important to match blood flow to oxygen demand in the brain and contracting muscles. During intermittent handgrip exercise for instance, NOS inhibition via NG-monomethyl-Arginine reduces muscle blood flow [7] and total vasodilator responses to muscle contraction [8]. NO is also an important neurotransmitter and neuromodulator (chemical messenger, [9]). It is involved in cerebral blood flow auto-regulation [10] and neurovascular coupling [11,12].

A reduction in NO bioavailability has been singled out as the main cause of endothelial dysfunction [13]. The latter is recognized as an important predictive factor for several cardiovascular disorders and has been implicated in the pathogenesis of hypertension, atherosclerosis, arterial thrombosis [14–16]. Advanced age is associated with endothelium dysfunction due to impairments in NO signalling pathways. Several possible mechanisms may underlie this impairment in NO metabolism, including limited substrate (arginine, [17]) and cofactor bioavailability (e.g. tetrahydrobiopterin, [18]) and reduced abundance or activity of NOS. In addition to vascular function, cardiorespiratory exercise responses are also considered as a reliable predictive factor for cardiovascular diseases [19,20]. Hence, some recent studies investigated the potential benefits of NO precursor supplementation on vascular function and exercise performance in the older population. Contrasting effects of chronic NO precursor (i.e. arginine, citrulline, nitrate) intake on exercise performances have been reported in older adults [for a review, see [21,22]]. While some studies found a positive effect of nitrate intake on exercise time to exhaustion [23,24] and oxygen consumption (VO2) response time [25], other authors showed no significant effect on exercise performance [26]. Some studies have also

shown positive vascular effects in older adults following acute and chronic nitrate intake, including reduced blood pressure (BP) [27,28], improved regional brain perfusion [29] and improvements in several parameters of vascular function [30]. However, Miller et al. [31] showed no effect of nitrate supplementation on BP despite increased plasma nitrate and nitrite. Regarding citrulline intake, while chronic supplementation has been shown to reduce BP [32], acute ingestion showed no effect on vascular function in older adults with heart failure [33]. These contrasting results may be due to different types of supplementation (i.e. NOS-independent or NOS-dependent supplementation), dosage or duration of supplementation, and health status of participants, making the potential interest and optimal strategy for NO precursor supplementation in older individuals still unclear.

Thus, this study aims to assess the effect of chronic NO precursor supplementation on vascular function, muscle and cerebral oxygenation and performance during both local and whole-body exercise in healthy older adults. To enhance NO bioavailability, nitrate and citrulline supplementation (N+C) were used in order to supplement both NOS-independent and NOS-dependent pathways, since ageing may impair NO bioavailability due to both an impairment in NOS activity and a lack of NOS substrate. We hypothesized that chronic NO precursor intake would improve vascular function and cerebral and muscular responses to exercise, leading to increased exercise performances.

Material and methods

Subjects

Twenty-four subjects (12 males, age 64 ± 2 years; body mass 73.5 ± 6.1 kg; height 178 ± 5 cm; 12 females, age 62 ± 2 years; body mass 57.1 ± 4.2 kg; height 154 ± 4 cm), were enrolled according to the following inclusion criteria: healthy, no more than 2 sessions of physical activity at low to moderate intensity per week, age between 60 and 70 years old, body mass index between 18 and 30 kg·m-2, non-smokers and no medication (except hormonal treatment). All participants had to be free from any use of food supplements or particular diet. The study was approved by the local ethics committee (CPP Sud-Est V, 2014-A01876-41) and performed according to the Declaration of Helsinki. Subjects were fully informed of the procedure and risks involved and gave their written consent.

Study design

In this double blind, randomized study, after a familiarization session, each participant was tested before (2 experimental sessions) and after (2 experimental sessions) one month of daily intake of NO precursors or placebo (figure 4). A recovery period of at least two days separated each experimental session. All tests were performed at least 6 h after the last supplementation to avoid the acute effect of NO precursors. The day before each testing session and on the testing days, subjects were instructed to adhere to their normal living and dietary routines, to avoid caffeine, dehydration or excessive hydration. During the supplementation period, subjects were also instructed to refrain from using any kind of mouth wash. Nutrition and physical activity before and during the protocol were recorded on a diary and controlled by the investigators.

During the first experimental session, resting arterial BP (Digital Blood Pressure Monitor, A&D Medical, Sydney, Australia) and arterial stiffness as pulse wave velocity (PWV; COMPLIOR device, ALAM Medical, Colson, Les Lilas, France) were measured three times. Then, subjects performed an ischemia-reperfusion test on the lower limb to evaluate the NO dependent vasodilation (see below). Following this evaluation, participants sat in a custom-built chair, with the right knee flexed at 90º and the ankle fixed to a strain gauge (Meiri F2732, Celians, Montauban, France), and performed an incremental intermittent isometric knee extension test. After a standardized 5-min warm up phase, subjects performed four maximal voluntary contractions (MVC) with 1 min of rest in between and MVC was determined as the highest force peak among the four trials. Then, exercise started at a target force of 35% MVC which was increased by 5% every 4 min. Subjects followed the instructions of a soundtrack to contract (5 s) and relax (4 s) the right quadriceps according to a visual signal displaying the target force level. Task failure was defined as the inability of the subject to perform three consecutive contractions adequately (i.e. if the contraction was not of 5-s duration or if the mean contraction torque was lower than the target torque for >2s). During the knee extension test, cerebral and muscle oxygenation was measured by near infrared spectroscopy (NIRS) (see below).

During the second experimental session, subjects breathed through a face-mask and were blinded to the inhaled gas mixture composition delivered by an IsoCap-Altitrainer 200® (SMTEC, Nyon, Switzerland). During the initial phase, subjects sat quietly in a semi-recumbent position and inhaled various gas mixtures in order to evaluate the cerebrovascular reactivity: first, subjects inhaled a normoxic gas mixture for 5 min (inspiratory oxygen fraction, FiO2 = 0.21; normoxia); then, they inhaled a normoxic hypercapnic gas mixture (FiCO2 = 0.04-0.07%)

individually and continuously adjusted to induce for 5 min an end-tidal partial pressure of CO2 (PetCO2) 10 mmHg above the initial normoxic PetCO2; after another 5-min normoxic phase, subjects inhaled a hypoxic gas mixture (FiO2 = 0.12) for 5 min. After these resting measurements, subjects continued to inhale the hypoxic gas mixture (FiO2 = 0.12) and were installed on a cycle ergometer (Lode® CORIVAL, Groningen, The Netherlands) to start cycling at a constant-load of 70 W (males) or 50 W (females) for 10 min (hypoxic cycling), followed by another 10-min constant cycling phase at the same workload while inhaling a normoxic gas mixture (normoxic cycling). These two 10-min cycling phases allowed evaluating the cardiovascular exercise hypoxic responses [79]. Finally, starting from this initial workload, a maximal incremental cycling test was performed with an increment of 10 W every minute until volitional exhaustion. Throughout the test, cerebral and muscle oxygenation was measured by NIRS, arterial oxygen saturation was recorded by finger pulse oximetry (Masimo Radical 7, Masimo Corp., Irvine, CA), BP was measured on the right arm with a digital pressure monitor system (Digital Blood Pressure Monitor A&D Medical, Sydney, Australia) and minute ventilation (VE) and gas exchanges (VO2, VCO2, PETCO2) were monitored breath-by-breath using a metabolic cart (MetaMax 3B, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Germany). Gas analysers and volume transducers were calibrated prior to each test with a 3-L syringe and references gases, respectively, according to manufacturer's instructions.

These two experimental sessions (PRE) were repeated identically after the one-month supplementation period (POST).

NO precursor supplementation

The NO precursor beverage (N+C) was composed of nitrate-rich natural dried salad extract and citrulline. It supplied 520 mg of nitrate (8.6 mmol) and 6 g of citrulline. These doses has been shown to respectively increase significantly plasma nitrite and arginine without causing any intestinal problems. The placebo beverage (PLA) was composed of nitrate-free cherry tail juice and was of similar colour and taste than the N+C beverage. The two supplements had the same carbohydrate profile. Both the experimenters and the subjects were blinded for the composition of the beverages. After the first initial evaluation visits, subjects were randomized into the N+C or the PLA groups and were asked to drink the beverage every morning.

Pulse wave velocity

PWV was analysed with a non-invasive automatic device (COMPLIOR device, ALAM Medical). Arterial stiffness measured by PWV has been shown to be acutely influenced by vascular tone and constitutively released NO [80]. The PWV measurement technique has been described previously elsewhere [81,82]. Briefly, common carotid artery and femoral artery pressure waveforms were recorded noninvasively. The pressure waveforms were digitized at the sample acquisition frequency of 500 Hz. A pre-processing system automatically analysed the gain in each waveform and adjusted it for equality of the 2 signals. When the operator observed a pulse waveform of sufficient quality on the computer screen, digitization was suspended and calculation of the time delay between the 2 pressure upstrokes was initiated. Measurements were repeated over at least 5 different cardiac cycles, and the mean was used for the final analysis. The distance travelled by the pulse wave was measured over the body surface as the distance between the 2 recording sites (D), whereas pulse transit time (t) was automatically determined by the Complior device; PWV was automatically calculated as PWV=D/t, and 80% of this distance defined the pulse wave travelled distance (common carotid artery-common femoral artery × 0.8).

Ischemia-reperfusion test

A pneumatic cuff (Santelec, Cestas, France) was positioned proximally on the right thigh. After completion of a 5-min baseline phase, a rapid arterial occlusion (<30 s) of the right leg was induced by manual inflation of the pneumatic cuff at 250 mmHg. The cuff remained inflated for 5 min. The arterial cuff was rapidly deflated in less than 5 sec to initiate the reperfusion phase. The reperfusion was monitored for 5 min. During the reperfusion phase, kinetics of NIRS signals were recorded to evaluate post-ischemic vasodilation as previously described [83].

Near infrared spectroscopy (NIRS)

Oxy[HbO2]-, deoxy[HHb]-, total[HbTot]-haemoglobin concentration and tissue saturation index (TSI) changes were estimated throughout testing sessions over multiple sites using a two-wavelength (780 and 850 nm) multichannel, continuous wave NIRS system (Oxymon MkIII, Artinis Medical Systems, the Netherlands). Quadriceps muscle hemodynamic was assessed from the right vastus lateralis using a 4-cm interoptodes distance. Probe holder was secured to the skin using double-sided tape and covered with a black sweatband to shield the optodes from ambient light. Left pre-frontal cortex hemodynamic was assessed between

Fp1 and F3 locations according to the international 10–20 EEG system with 3.5-cm interoptodes distance. The probe holders were secured to the skin with double-sided tape and maintained with Velcro headbands. Data were recorded continuously at 10 Hz and filtered with a 1-s width moving Gaussian smoothing algorithm before analysis.

Data analysis

Ischemia-reperfusion NIRS response was characterized by changes in HbTot concentration as a quantitative index of blood volume and by changes in HbO2 concentrations as a qualitative index of tissue oxygen delivery during the post-ischemia phase. During the reperfusion phase, the difference between the value at the end of the ischemia phase and the maximal value reached during the reperfusion phase (Δmax/min) represents the lower-limb post-ischemic vascular reactivity. Resting hypercapnic and hypoxic responses were characterized by changes in cardiovascular and cerebrovascular parameters between the initial 5-min normoxic phase and the 5-min hypoxic or 5-min hypercapnic phases (the last 60 s of each phase were used for analysis). Exercise hypoxic responses were characterized by changes in cardiovascular and cerebrovascular parameters between the 10-min normoxic cycling phase and the 10-min hypoxic cycling phase (the last 60 s of each phase were used for analysis).

Owing to the between-subject variability in time to task failure during knee extension exercise and incremental cycling test, all data were normalized as a percentage of endurance time [84]. Data from experimental sessions before and after the supplementation period were compared at different time points: i) at 25% (25%), ii) at 50% (50%), iii) 75% (75%), iv) 100% (100%) of the duration of the test performed before the supplementation period, and iv) during the last 30 s of the knee extension exercise or incremental cycling test (exhaustion).

Statistical analysis

Power assessment for the primary outcome (exercise performance) was based on a minimum expected NO precursor effect of 10%. We set α level of 5% and power of 80%, 24 subjects were required. Statistical analysis were conducted with n = 24 for all evaluations except for TSI in pre-frontal cortex and quadriceps muscles (n = 23) due to technical issues. Data were analyzed with SPSS v.24 software (SPSS Inc, Chicago, United states). Data from PRE and POST supplementation period in each group were compared using two-way (N+C/PLA group × PRE/POST session) ANOVA after establishing that data conformed to a normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test). Least Squares Difference (LSD) post hoc analyses were performed when a significant ANOVA effect was identified.

Partial eta square (pη2) values are reported as measures of effect size, with moderate and large effects considered for pη2 ≥ 0.07 and pη2 ≥ 0.14, respectively (Cohen, 1988). Data were also analyzed as differences between PRE and POST supplementation period (ΔPRE/POST). In this case, ΔPRE/POST between the N+C and PLA groups were compared with paired t-test and Cohen's delta (d) determined the effect size and practical significance of N+C effect. Effect sizes were classified as small if d ≤ 0.2, medium if d ≈ 0.5, and large if d ≥ 0.8 [85]. For all statistical analyses, a two-tailed alpha level of 0.05 was used as the cut off for significance. All data are presented as mean values ± SD.

Results

Vascular function

Resting vascular function parameters are provided in table 1. After one month of supplementation, systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure did not change significantly although the reduction in SBP almost reached significance (p = 0.058, d = 0.660) in the N+C group compared to placebo (PLA). As shown in figure 1, there was a significant decrease in mean blood pressure (MBP) (p = 0.047, Cohen's d = 0.71) in the N+C group compared to PLA.

There was no significant difference between groups for PWV (all p > 0.05). Similarly, there was no significant difference between groups for post-ischemia Δmax/min HbO2 and Δmax/min HbTot (all p > 0.05).

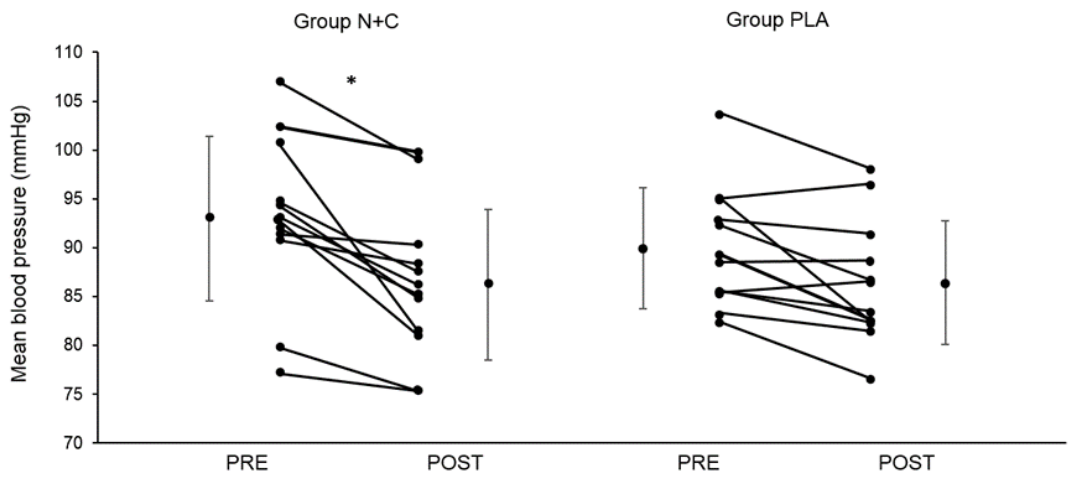


Figure 1. Individual and group mean changes in mean arterial blood pressure before and after one month of placebo or nitrate and citrulline intake in older adults. N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; * significant difference between PRE and POST; n=24.

Hypercapnia and hypoxia responses

As shown in table 2, there was no effect of NO precursor supplementation on hypercapnic responses at rest (all $p > 0.05$). As shown in table 3, there was also no effect of NO precursor supplementation on hypoxic responses, neither at rest nor during submaximal cycling exercise (all $p > 0.05$).

		PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
SBP (mmHg)	**N+C**	123.2 ± 13.9	115.7 ± 12.3	-7.5 ± 6.5	0.058	0.660
	PLA	117.8 ± 7.2	114.3 ± 8.9	-3.4 ± 5.7		
DBP (mmHg)	**N+C**	78.2 ± 6.5	71.9 ± 5.8	-6.2 ± 5.1	0.130	0.460
	PLA	76.0 ± 9.8	72.1 ± 6.9	-3.9 ± 4.6		
PWV ($m \cdot s^{-1}$)	**N+C**	9.2 ± 5.9	7.0 ± 2.8	-2.2 ± 5.3	0.220	0.550
	PLA	6.7 ± 2.7	6.7 ± 3.1	0.0 ± 2.1		
Reperfusion (mmol of HbO_2)	**N+C**	15.9 ± 11.2	14.4 ± 10.3	-1.5 ± 3.1	0.250	0.200
	PLA	12.7 ± 6.7	12.6 ± 5.3	-0.7 ± 4.9		
Reperfusion (mmol of Hbtot)	**N+C**	10.8 ± 4.2	10.5 ± 6.3	-0.2 ± 2.9	0.710	0.130
	PLA	9.2 ± 4.9	8.4 ± 2.3	-0.7 ± 4.3		

Data are presented as mean ± SD, n = 24. SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; PWV, carotid-femoral pulse wave velocity; Reperfusion, difference between the value reached at the end of the ischemic phase and the maximal value reached during the reperfusion phase in the ischemia-reperfusion test; HbO_2, oxyhaemoglobin; HbTot, total haemoglobin. PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period. N+C, nitrate + citrulline, PLA, placebo; ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 1. Vascular function before and after one month of NO precursor supplementation.

			PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
ΔHR (bpm)		N+C	4.9 ± 3.2	2.6 ± 5.2	-2.3 ± 4.3	0.390	0.120
		PLA	2.7 ± 3.7	1.0 ± 5.3	-1.7 ± 6.0		
ΔVE ($l \cdot min^{-1}$)		N+C	18.3 ± 9.6	22.3 ± 13.9	4.0 ± 8.2	0.240	0.290
		PLA	15.8 ± 9.2	17.5 ± 7.2	1.7 ± 7.5		
ΔTSI%	Cerebral	N+C	2.7 ± 4.7	4.3 ± 1.9	0.4 ± 5.2	0.121	0.710
		PLA	6.0 ± 3.0	3.5 ± 3.6	-2.5 ± 2.3		
	Muscle	N+C	0.9 ± 3.4	-0.2 ± 3.3	-0.7 ± 3.2	0.739	0.296
		PLA	1.3 ± 4.5	0.0 ± 1.7	-1.3 ± 4.4		

Data are presented as mean ± SD, n = 24 (n = 23 for TSI). Hypercapnia corresponded to a CO_2 end tidal partial pressure of +10 mmHg above normoxic level; ΔHR, Heart rate difference between normoxia and hypercapnia; ΔVE, minute ventilation difference between normoxia and hypercapnia; ΔTSI, tissue saturation index difference between normoxia and hypercapnia; N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period. ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 2. Cardiorespiratory, cerebral and muscle responses to hypercapnia before and after one month of NO precursor supplementation.

Knee extension exercise performance

There was no significant difference between groups regarding MVC and the total number of contractions during the knee extension exercise test ($p > 0.05$, table 5). There was also no significant difference between groups for TSI (table 4) and all other NIRS parameters (results not shown; all $p > 0.05$) during knee extensions.

Incremental cycling exercise test

The increase in maximal power output between PRE and POST was significantly larger in the N+C group compared to PLA ($p < 0.05$, table 5). Figure 2 shows heart rate and VO_2 kinetics during the cycling exercise. There was a significant ANOVA main group effect on ΔPRE/POST for heart rate and VO_2 during cycling (at 25%, 50%, 75%, and 100% of the first test duration, *i.e.* at isowatt). The reduction in heart rate and VO_2 was significantly larger in the N+C group compared to PLA. However, there was no effect on maximal heart rate and VO_2 (all $p > 0.05$; figure 2, table 5) nor on submaximal and maximal VE (results not shown; all $p > 0.05$). There was no significant difference between groups for TSI (Table 4) and all other NIRS parameters (results not shown; all $p > 0.05$) during cycling.

				PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
Rest	ΔHR (bpm)		N+C	6.6 ± 6.5	4.6 ± 2.9	-2.6 ± 5.9	0.225	0.321
			PLA	5.3 ± 4.2	4.8 ± 5.2	-0.6 ± 6.4		
	ΔVE ($l \cdot min^{-1}$)		N+C	-2.0 ± 1.2	-1.5 ± 1.4	0.4 ± 1.8	0.130	0.470
			PLA	-1.1 ± 1.7	-1.6 ± 2.1	-0.5 ± 2.0		
	ΔSpO_2 (%)		N+C	86.6 ± 4.4	86.7 ± 4.4	-0.5 ± 4.7	0.400	0.110
			PLA	83.9 ± 7.9	83.6 ± 4.4	0.3 ± 9.5		
	ΔTSI%	Cerebral	N+C	-4.3 ± 7.6	-3.7 ± 1.9	-1.5 ± 7.5	0.440	0.768
			PLA	-4.4 ± 3.2	-3.9 ± 2.3	0.5 ± 3.1		
		Muscle	N+C	-0.8 ± 2.0	0.2 ± 4.3	0.7 ± 4.7	0.260	0.959
			PLA	-0.3 ± 1.0	-1.4 ± 1.7	-1.1 ± 1.4		
Cycling	ΔHR (bpm)		N+C	10.9 ± 9.9	14.3 ± 7.6	3.4 ± 8.9	0.280	0.240
			PLA	14.8 ± 13.8	14.8 ± 11.5	-0.1 ± 17.4		
	ΔVE ($l \cdot min^{-1}$)		N+C	4.2 ± 9.3	6.5 ± 6.9	2.4 ± 11.2	0.230	0.310
			PLA	5.9 ± 9.5	5.2 ± 7.2	-0.7 ± 8.4		
	ΔSpO_2 (%)		N+C	76.1 ± 6.2	77.8 ± 9.1	1.7 ± 6.7	0.350	0.150
			PLA	73.7 ± 9.7	73.9 ± 10.5	0.3 ± 11.5		
	ΔTSI%	Cerebral	N+C	-13.6 ± 27.4	-7.6 ± 3.3	-1.4 ± 10.1	0.198	0.737
			PLA	-8.7 ± 6.8	-5.4 ± 4.8	3.3 ± 4.4		
		Muscle	N+C	-0.6 ± 5.3	0.4 ± 10.5	-3.1 ± 5.1	0.788	0.393
			PLA	-0.9 ± 2.9	-3.5 ± 1.9	-2.6 ± 3.4		

Data are presented as mean ± SD, n = 24 (n = 23 for TSI). Hypoxia corresponded to an inspired fraction of oxygen of 11%. ΔHR, heart rate difference between normoxia and hypoxia; ΔVE, ventilation difference between normoxia and hypoxia; ΔSpO_2, pulse oxygen saturation difference between normoxia and hypoxia; ΔTSI, tissue saturation index difference between normoxia and hypoxia; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 3. Cardiorespiratory, cerebral and muscle responses to hypoxia at rest and during cycling exercise before and after one month of NO precursor supplementation.

			PRE		POST	
			50%	Exhaustion	50%	Exhaustion
Cycling	Cerebral	N+C	1.9 ± 4.8	-4.2 ± 3.5	-1.6 ± 1.5	-5.3 ± 4.9
		PLA	-0.1 ± 7.5	0.1 ± 8.4	-2.3 ± 2.5	-5.3 ± 3.7
	Muscle	N+C	-0.9 ± 0.5	-1.0 ± 2.0	0.9 ± 7.8	-1.1 ± 3.5
		PLA	-1.5 ± 0.7	-2.7 ± -3.5	-2.2 ± 1.5	3.4 ± 1.5
Knee extension	Cerebral	N+C	1.5 ± 4.2	-1.9 ± 3.7	0.9 ± 4.2	-2.1 ± 4.2
		PLA	-0.6 ± 5.0	-3.0 ± 4.8	-0.6 ± 3.7	-1.8 ± 5.7
	Muscle	N+C	-9.5 ± 8.3	-8.3 ± 11.6	-9.4 ± 6.4	-8.0 ± 9.0
		PLA	-11.2 ± 4.9	-12.5 ± 7.4	-12.4 ± 7.2	-12.0 ± 9.4

Data are presented as mean ± SD changes of tissue saturation index in % from the initial workload (70W for males and 50W for females), n = 23. N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; 50%, 50% of the duration of the PRE test (i.e. isowatt for cycling exercise and isoKg for knee extension exercise).

Table 4. Tissue saturation index during the cycling test and knee extension test before and after one month of NO precursor supplementation.

		PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
Maximal power output (W)	N+C	180.9 ± 44.3	190.3 ± 47.5	9.4 ± 11.1	0.021	0.411
	PLA	206.0 ± 54.5	207.4 ± 53.9	1.3 ± 7.2		
VO_2 max ($ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$)	N+C	39.6 ± 7.3	40.6 ± 6.5	1.2 ± 3.8	0.920	0.040
	PLA	45.4 ± 7.7	46.6 ± 7.9	1.4 ± 2.8		
MVC (Kg)	N+C	63.1 ± 14.0	65.6 ± 18.0	2.5 ± 7.6	0.350	0.340
	PLA	67.3 ± 9.6	65.5 ± 12.3	0.2 ± 5.5		
Number of contractions	N+C	149.0 ± 44.0	153.0 ± 46.0	4.1 ± 35.1	0.650	0.020
	PLA	161.0 ± 33.0	165.0 ± 48.0	5.0 ± 33.2		

Data are presented as mean ± SD, n = 24. MVC, maximal voluntary contraction; VO_2max, maximal oxygen consumption; N+C, nitrate + citrulline, PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 5. Performances during the cycling test and the knee extension test before and after one month of NO precursor supplementation.

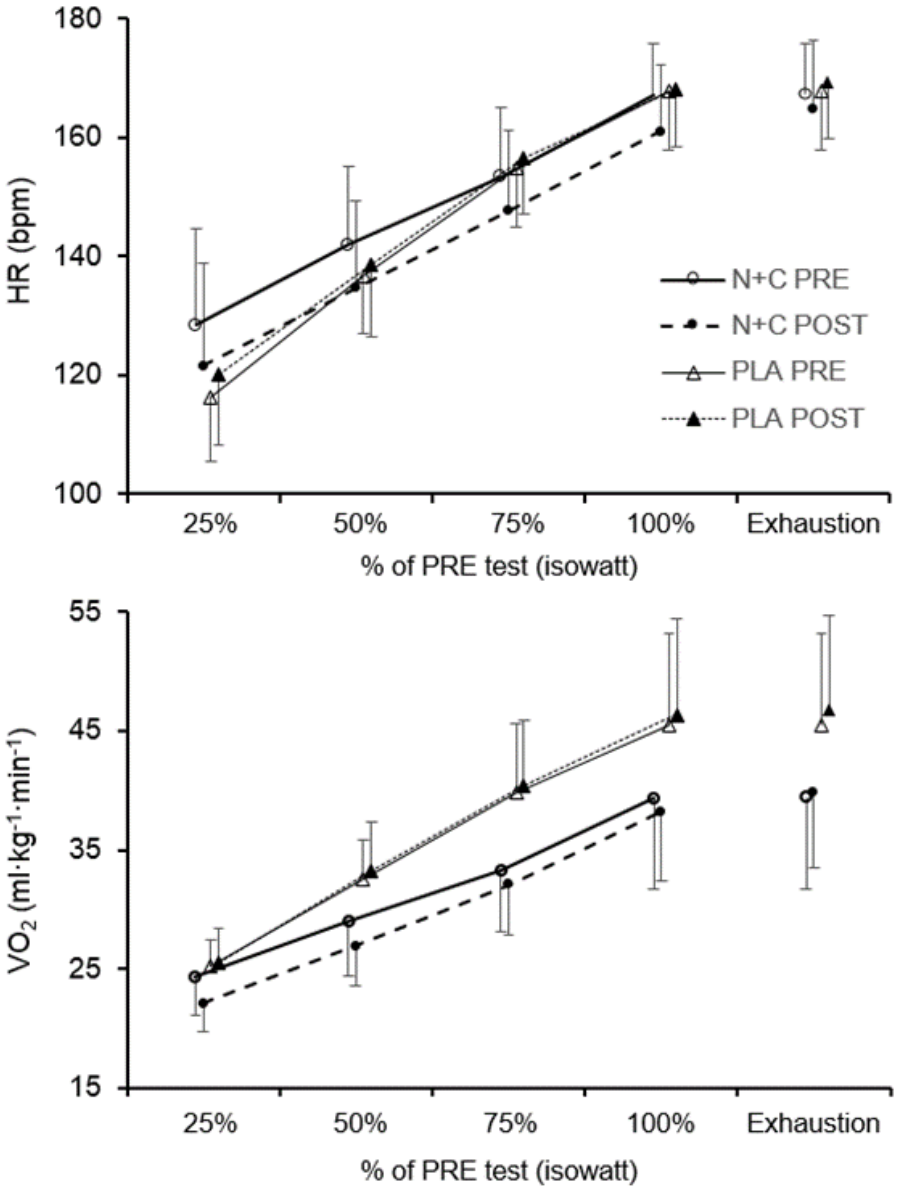


Figure 2. Heart rate and oxygen consumption during the cycling incremental test before and after one month of placebo or nitrate and citrulline intake in older adults. HR, heart rate; VO_2, oxygen consumption; N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; 25%; 50%; 75%; 100%, 25%, 50%, 75% and 100%, of the duration of the PRE test (*i.e.* isowatt).

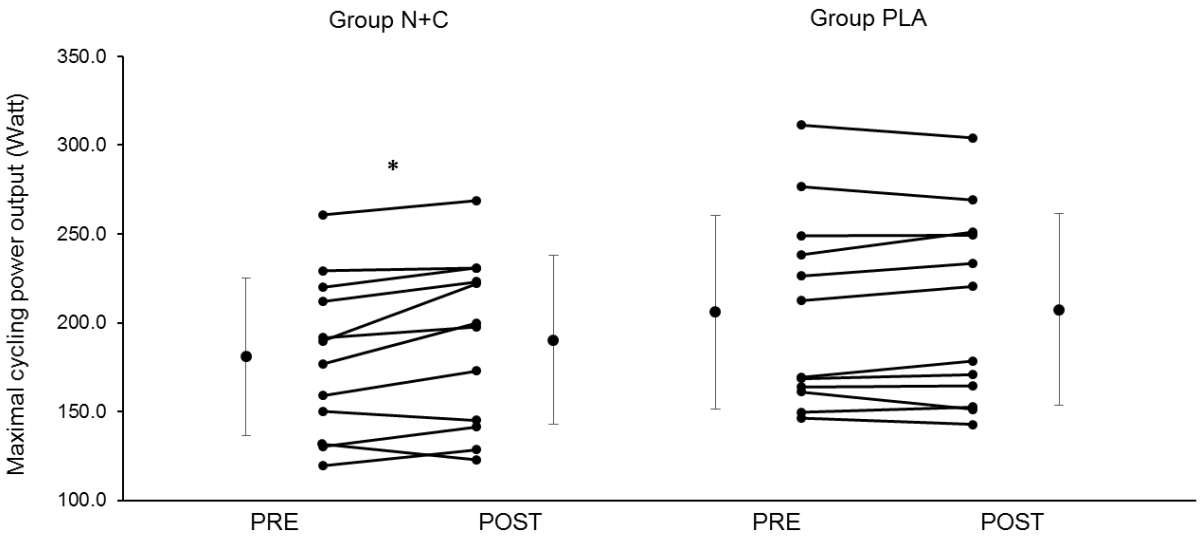


Figure 3. Individual and group mean changes in maximal cycling power output before and after one month of placebo or nitrate and citrulline intake in older adults. N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; * significant difference between PRE and POST; n=24.

Discussion

The main results of the present study are that, chronic NO precursor ingestion in healthy older adults i) decreased mean arterial BP but had no effect on arterial stiffness, post-ischemic vasodilation, and cardiovascular and cerebrovascular responses to hypercapnia and hypoxia, ii) had no effect on muscle and cerebral oxygenation during exercise, iii) had no effect on muscle strength and endurance during isometric knee extensions, and iv) increased maximal power output and decreased submaximal heart rate and VO2 during cycling. Taken together, our findings suggest that, in healthy older adults, a one-month supplementation of both NOS-independent and NOS-dependent pathways can improve arterial BP and increase maximal cycling capacity possibly due to a reduction in the O2 cost of cycling.

Vascular function

Results from meta-analysis showed that in healthy subjects, acute and chronic (1 to 6 weeks) nitrate supplementation induces a mean SBP reduction of □4 mmHg [34,35]. In older adults, previous studies reported an improvement [23,36,37] or no change [38,39] in BP. Regarding citrulline, recent reviews reported that chronic intake has little or no effect on resting BP in healthy subjects [40] while in hypertensive patients it improves significantly endothelial dysfunction [22]. In the present study, 4 weeks of daily nitrate and citrulline intake induced a 7.5 and 6.8 mmHg reduction in SBP and MBP in older adults, confirming the beneficial effect of NO precursor supplementation on resting BP. Based on the current knowledge regarding the impact of ageing on the endothelium function and NO metabolism [41], this beneficial effect could be due to both improved NOS-independent (i.e. enhanced nitrite reduction to NO) and/or NOS-dependant (i.e. increased NO production by NOS due to enhanced citrulline-arginine availability) NO production pathways.

This positive effect of NO precursors on BP was however not associated with an improvement in PWV and post-ischemic vasodilation. Arterial stiffness as assessed by PWV results from two distinct components in the arterial media: a structural and a dynamic component. The structural component is represented by the collagen and elastin fibers as well as other connecting molecules. The dynamic component is represented by the tone of smooth muscle cells, especially in the more muscular arteries, which is dependent on released of vasoactive substances such as NO [42]. Previous studies have shown an improvement [43,44] or no change [45,46] in PWV following chronic nitrate or citrulline intake in healthy subjects. Regional heterogeneity in arterial stiffening has been reported with advancing age [47,48]. There is a

marked increase in aortic stiffness due to wall damage with ageing, while peripheral arterial stiffness is generally preserved in individuals >50 years. Since NO could lower vascular smooth muscle tone especially in more muscular arteries, NO precursor intake could reduce brachial BP without altering stiffness in larger elastic arteries, as observed in the present study.

Previous studies reported an improvement in post-ischemic vasodilation following both acute and chronic nitrate supplementation in patients [49], healthy adults [50] as well as in older adults [51]. Since the nitrate-nitrite-NO pathway contributes to NO production especially under hypoxic conditions [52], ischemic conditions may be particularly prone to show the positive effect of nitrate supplementation. A recent meta-analysis has shown that nitrate intake increases post-ischemic vasodilation to a greater extent in patients with impaired cardiovascular status compared with healthy subjects [53], suggesting that individuals with impaired endothelial function are more prone to benefit from nitrate intake. Conversely, improvement in endothelial function has not been reported following acute or chronic (~7 days) intake of citrulline in healthy subjects [4,33,54]. While a reduction in arterial oxygen pressure could lead to NOS-activity alteration, the previous and present results suggest that arginine bioavailability may not to be a limiting factor during post-ischemic vasodilation. One possible explanation for the lack of nitrate effect in the present study compared to previous studies mentioned above is that vascular dysfunction in older adults might be explained by other factor than NO bioavailability, e.g. by smooth muscle cell structure alteration [55]. While vascular alteration in patients is often characterised by low arginine/asymmetric dimethyl-arginine ratio, indicating a reduction of NO synthesis by NOS, in older adults this ratio is close to young healthy subject level [17]. Another aspect to consider is that post-ischemic vasodilatation has been assessed by Doppler ultrasound in the previous studies cited above while NIRS was used in the present study as an indirect, semi-quantitative measure of microvascular blood flow. We assessed microvascular function by NIRS since it may be more sensitive to the cardiovascular risk [56].

Hypercapnic and hypoxic responses

NO has been shown to play a significant role in the regulation of blood flow under hypercapnic [57] and hypoxic [58] conditions. To our knowledge, this is the first study assessing the effect of NO precursor intake on hypercapnic cardiorespiratory and cerebral responses. The lack of effect of NO precursors on cerebrovascular response to hypercapnia may due to the multi-factorial regulation of CO2 responses, not only involving NO. For instance, cerebral

autoregulation is known to rely on mechanisms involving adenosine, prostaglandins and anaerobic neuronal metabolism [59].

Since NOS-independent NO synthesis is facilitated by the presence of deoxyhaemoglobin [60,61], it has been postulated that an upregulation of the nitrate-nitrite-NO pathway could increase blood flow where O2 supply is limited [52]. There are limited and contrasted available data on the effect of NO precursor intake on hypoxic physiological responses in young healthy adults, and no study in older adults. While Oliver M. Shannon et al. [62] have shown that acute and chronic nitrate intake increased arterial oxygen saturation and cerebral but not muscle oxygenation during exercise at 4300 m, Masschelein et al. [63] have shown that chronic nitrate intake increased muscle but no cerebral oxygenation during exercise at 5000 m. In the present study, cerebral and muscle oxygenation measured by NIRS showed that both nitrate and citrulline chronic intake had no effect on hypoxic responses at rest as well as during submaximal exercise in healthy older individuals. Hence, despite the potential down regulation associated with hypoxia on NO production by the NOS dependent pathway, supplementing NOS with citrulline as well as the NOS-independent pathway with nitrate may not improve hypoxic responses. As recently emphasized in the review by Oliver Michael Shannon et al. [64], further studies specifically focusing on the effect of NO precursors on hypoxic responses are however required.

Incremental knee extension test

The unchanged knee extensor MVC following chronic NO precursor intake in older individuals is consistent with the literature regarding NO precursor effects on maximal force production in healthy adults [65–69]. In addition, the present study showed for the first time in older individuals no effect of NO precursors on isolated muscle endurance (i.e. total number of knee extensions), which is in contrast to previous results obtained in healthy young adults [65,67,68]. The lack of NO precursor effect on knee extension performance is consistent with the similar muscle and cerebral oxygenation measured by NIRS during exercise. Hence, in older adult, NO bioavailability may not be the limiting factor for muscle and cerebral oxygen delivery during isolated muscle exercise and as a consequence chronic NO precursor intake did not improve knee extension performance.

Incremental cycling exercise

Previous studies in healthy subjects showed a positive effect of citrulline [70] or nitrate [71,72] supplementation on exercise endurance performance. An improvement in O2 cost during exercise has also been reported [73], that could be a result of an improvement in mitochondrial function and oxidative phosphorylation efficiency [74]. Regarding older adults, four out of five studies assessing exercise performance found positive effects of chronic nitrate supplementation on time to exhaustion during submaximal exercise [23,24,37] and in VO2 response time [25], while only one study showed no significant effect on maximal exercise performances [26]. In the present study, 4 weeks of nitrate and citrulline supplementation reduced submaximal cycling exercise VO2 and heart rate. This effect was associated with a significant increase in maximal cycling power output of 5.2% in the N+C group. Taken together, these results suggest that chronic NO precursor intake increases whole body exercise endurance performance by reducing the O2 cost of cycling. This might be due to an improvement in the ATP-O2 ratio and/or the ATP cost of muscle contraction following increased NO bioavailability [71]. The increase in cycling performance despite no difference in muscle and cerebral oxygenation patterns between groups suggests that this ergogenic effect of NO precursor intake in healthy older adults may not to be due to an improvement in muscle and cerebral perfusion and oxygen delivery.

Methodological consideration

Blood concentrations of citrulline and nitrate were not assessed in the present study. Nevertheless, previous studies have reported significant increases in blood concentrations of NO metabolites or citrulline after similar nitrate or citrulline acute and chronic supplementations [4,75]. In contrast to previous studies assessing subjects on average 2 to 3 h after the last nitrate or citrulline intake, in the present study all tests were performed at least 6 h after the last NO precursor intake to avoid the acute effect of the supplementation and, instead, to focus on the chronic, long-lasting effect of the supplementation. Pharmacokinetics studies have shown that blood nitrite and arginine concentrations reach a peak 2 to 3 h after nitrate or citrulline supplementation before progressively returning to baseline values 5 to 8 h after intake [76,77], these kinetics remaining identical even after chronic supplementation [4,76,78]. Hence, in the present study, NO bioavailability during the post-supplementation testing session (at least 6 h after the last intake) may have been lower than in previous studies having assessed the effect of chronic NO precursor supplementation within 2-3 h after the last intake. This could account

for the absence of some significant effects in the present work (e.g. on arterial stiffness and endothelial function) compared to previous studies. Conversely, the significant improvements in BP and cycling exercise responses observed in the N+C group indicate that chronic nitrate and citrulline supplementation in healthy older individuals induces positive outcomes due to mechanisms beyond those induced by acute NO precursor intake, e.g. a permanent increase in NO bioavailability and/or changes in muscle metabolic or contractile efficiency.

Conclusion

The present study shows that chronic nitrate and citrulline intake significantly decreased arterial BP, submaximal VO2 and heart rate during cycling exercise, and increased maximal cycling power output in healthy older adults. This was associated with no change in arterial stiffness, vascular reactivity, cerebral and muscle oxygenation during exercise and isolated knee extensor muscle strength and endurance. Hence, this study suggests that chronic supplementation of NOS-dependent and independent NO production pathways in older adults has positive effects on BP and whole body exercise performance which are important health-related physiological outcomes especially regarding ageing and cardiovascular risks.

Acknowledgment. We thank all the subjects for participating in the study as well as the staff of the Sport and Pathologies Unit of the Grenoble Alpes Hospital for technical assistance.

Conflicts of interest. The authors report no conflicts of interest associated with this manuscript.

Funding. This work was funded by Fitness-Boutique©.

References

1. Hirst DG, Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2011; 704: 1–13.

2. Chin-Dusting JPF, Willems L, Kaye DM. L-arginine transporters in cardiovascular disease: a novel therapeutic target. Pharmacol Ther. 2007; 116: 428–36.

3. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. Free Radic Biol Med. 2004; 37: 395–400.

4. Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. Br J Clin Pharmacol. 2008; 65: 51–9.

5. Waugh WH, Daeschner CW, Files BA, McConnell ME, Strandjord SE. Oral citrulline as arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. J Natl Med Assoc. 2001; 93: 363–71.

6. Wijnands KAP, Vink H, Briedé JJ, van Faassen EE, Lamers WH, Buurman WA, Poeze M. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. PloS One. 2012; 7: e37439.

7. Gilligan DM, Panza JA, Kilcoyne CM, Waclawiw MA, Casino PR, Quyyumi AA. Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. Circulation. 1994; 90: 2853–8.

8. Casey DP, Walker BG, Ranadive SM, Taylor JL, Joyner MJ. Contribution of nitric oxide in the contraction-induced rapid vasodilation in young and older adults. J Appl Physiol. 2013; 115: 446–55.

9. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 1994; 14: 5147–59.

10. White RP, Vallance P, Markus HS. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on dynamic cerebral autoregulation in humans. Clin Sci Lond Engl 1979. 2000; 99: 555–60.

11. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment — From bench to bedside. Exp Neurol. 2015; 263: 235–43.

12. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. Nature. 2010; 468: 232–43.

13. Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. Diabetes Care. 2009; 32 Suppl 2: S314-321.

14. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. Cardiovasc Res. 2005; 66: 286–94.

15. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. Lancet Lond Engl. 1997; 349: 837–42.

16. Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KRA, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. Circulation. 2002; 106: 653–8.

17. Gates PE, Boucher ML, Silver AE, Monahan KD, Seals DR. Impaired flow-mediated dilation with age is not explained by L-arginine bioavailability or endothelial asymmetric dimethylarginine protein expression. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2007; 102: 63–71.

18. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation. 2006; 113: 1708–14.

19. Williams PT. Physical fitness and activity as separate heart disease risk factors: a meta-analysis. Med Sci Sports Exerc. 2001; 33: 754–61.

20. Gray BJ, Stephens JW, Williams SP, Davies CA, Turner D, Bracken RM, Prosiect Sir Gâr Group. Cardiorespiratory fitness is a stronger indicator of cardiometabolic risk factors and risk prediction than self-reported physical activity levels. Diab Vasc Dis Res. 2015; 12: 428–35.

21. Stanaway L, Rutherfurd-Markwick K, Page R, Ali A. Performance and Health Benefits of Dietary Nitrate Supplementation in Older Adults: A Systematic Review. Nutrients. 2017; 9.

22. Allerton TD, Proctor DN, Stephens JM, Dugas TR, Spielmann G, Irving BA. l-Citrulline Supplementation: Impact on Cardiometabolic Health. Nutrients. 2018; 10.

23. Berry MJ, Justus NW, Hauser JI, Case AH, Helms CC, Basu S, Rogers Z, Lewis MT, Miller GD. Dietary nitrate supplementation improves exercise performance and decreases blood pressure in COPD patients. Nitric Oxide Biol Chem. 2015; 48: 22–30.

24. Eggebeen J, Kim-Shapiro DB, Haykowsky M, Morgan TM, Basu S, Brubaker P, Rejeski J, Kitzman DW. One Week of Daily Dosing With Beetroot Juice Improves Submaximal Endurance and Blood Pressure in Older Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. JACC Heart Fail. 2016; 4: 428–37.

25. Kelly J, Fulford J, Vanhatalo A, Blackwell JR, French O, Bailey SJ, Gilchrist M, Winyard PG, Jones AM. 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. 2013; 304: R73-83.

26. Siervo M, Oggioni C, Jakovljevic DG, Trenell M, Mathers JC, Houghton D, Celis-Morales C, Ashor AW, Ruddock A, Ranchordas M, Klonizakis M, Williams EA. Dietary nitrate does not affect physical activity or outcomes in healthy older adults in a randomized, cross-over trial. Nutr Res N Y N. 2016; 36: 1361–9.

27. Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO, Weitzberg E. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. N Engl J Med. 2006; 355: 2792–3.

28. Kapil V, Milsom AB, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F, Arghandawi S, Pearl V, Benjamin N, Loukogeorgakis S, Macallister R, Hobbs AJ, Webb AJ, et al. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. Hypertens Dallas Tex 1979. 2010; 56: 274–81.

29. Presley TD, Morgan AR, Bechtold E, Clodfelter W, Dove RW, Jennings JM, Kraft RA, King SB, Laurienti PJ, Rejeski WJ, Burdette JH, Kim-Shapiro DB, Miller GD. Acute effect of a high nitrate diet on brain perfusion in older adults. Nitric Oxide Biol Chem. 2011; 24: 34–42.

30. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, Rashid R, Miall P, Deanfield J, Benjamin N, MacAllister R, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertens Dallas Tex 1979. 2008; 51: 784–90.

31. Miller GD, Marsh AP, Dove RW, Beavers D, Presley T, Helms C, Bechtold E, King SB, Kim-Shapiro D. Plasma nitrate and nitrite are increased by a high-nitrate supplement but not by high-nitrate foods in older adults. Nutr Res N Y N. 2012; 32: 160–8.

32. Gonzales JU, Raymond A, Ashley J, Kim Y. Does l-citrulline supplementation improve exercise blood flow in older adults? Exp Physiol. 2017; 102: 1661–71.

33. Kim I-Y, Schutzler SE, Schrader A, Spencer HJ, Azhar G, Deutz NEP, Wolfe RR. Acute ingestion of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015; 309: E915-924.

34. Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I, Mathers JC. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. J Nutr. 2013; 143: 818–26.

35. Ashor AW, Lara J, Siervo M. Medium-term effects of dietary nitrate supplementation on systolic and diastolic blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. J Hypertens. 2017; 35: 1353–9.

36. Kemmner S, Lorenz G, Wobst J, Kessler T, Wen M, Günthner R, Stock K, Heemann U, Burkhardt K, Baumann M, Schmaderer C. Dietary nitrate load lowers blood pressure and renal resistive index in patients with chronic kidney disease: A pilot study. Nitric Oxide Biol Chem. 2017; 64: 7–15.

37. Kenjale AA, Ham KL, Stabler T, Robbins JL, Johnson JL, Vanbruggen M, Privette G, Yim E, Kraus WE, Allen JD. Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2011; 110: 1582–91.

38. Gilchrist M, Winyard PG, Aizawa K, Anning C, Shore A, Benjamin N. Effect of dietary nitrate on blood pressure, endothelial function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes. Free Radic Biol Med. 2013; 60: 89–97.

39. Shepherd AI, Wilkerson DP, Fulford J, Winyard PG, Benjamin N, Shore AC, Gilchrist M. Effect of nitrate supplementation on hepatic blood flow and glucose homeostasis: a

double-blind, placebo-controlled, randomized control trial. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2016; 311: G356-364.

40. Mirenayat MS, Moradi S, Mohammadi H, Rouhani MH. Effect of L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure: a Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. Curr Hypertens Rep. 2018; 20: 98.

41. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2003; 42: 1149–60.

42. Mirea O, Donoiu I, Pleşea IE. Arterial aging: a brief review. Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol. 2012; 53: 473–7.

43. Bahra M, Kapil V, Pearl V, Ghosh S, Ahluwalia A. Inorganic nitrate ingestion improves vascular compliance but does not alter flow-mediated dilatation in healthy volunteers. Nitric Oxide Biol Chem. 2012; 26: 197–202.

44. Ochiai M, Hayashi T, Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K. Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. Int J Cardiol. 2012; 155: 257–61.

45. Lara J, Ogbonmwan I, Oggioni C, Zheng D, Qadir O, Ashor A, Brandt K, Mathers JC, Siervo M. Effects of handgrip exercise or inorganic nitrate supplementation on 24-h ambulatory blood pressure and peripheral arterial function in overweight and obese middle age and older adults: A pilot RCT. Maturitas. 2015; 82: 228–35.

46. Bondonno CP, Liu AH, Croft KD, Ward NC, Yang X, Considine MJ, Puddey IB, Woodman RJ, Hodgson JM. Short-term effects of nitrate-rich green leafy vegetables on blood pressure and arterial stiffness in individuals with high-normal blood pressure. Free Radic Biol Med. 2014; 77: 353–62.

47. Mitchell GF, Parise H, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasan RS, Levy D. Changes in Arterial Stiffness and Wave Reflection With Advancing Age in Healthy Men and Women. Hypertension [Internet]. 2004 [cited 2018 Oct 9]; . Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.0000128420.01881.aa

48. Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. Arterioscler Thromb J Vasc Biol. 1993; 13: 90–7.

49. Velmurugan S, Gan JM, Rathod KS, Khambata RS, Ghosh SM, Hartley A, Van Eijl S, Sagi-Kiss V, Chowdhury TA, Curtis M, Kuhnle GGC, Wade WG, Ahluwalia A. Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Am J Clin Nutr. 2016; 103: 25–38.

50. Heiss C, Meyer C, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Heinen Y, Luedike P, Keymel S, Ayoub N, Lundberg JO, Weitzberg E, Kelm M, Rassaf T. Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. Free Radic Biol Med. 2012; 52: 1767–72.

51. Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, Bernard A, Kelm M, Rassaf T. Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. J Am Coll Cardiol. 2014; 63: 1584–5.

52. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2008; 7: 156–67.

53. Jackson JK, Patterson AJ, MacDonald-Wicks LK, Oldmeadow C, McEvoy MA. The role of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular disease risk factors: a systematic review and meta-analysis of human evidence. Nutr Rev. 2018; 76: 348–71.

54. Churchward-Venne TA, Cotie LM, MacDonald MJ, Mitchell CJ, Prior T, Baker SK, Phillips SM. Citrulline does not enhance blood flow, microvascular circulation, or myofibrillar protein synthesis in elderly men at rest or following exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014; 307: E71-83.

55. Sehgel NL, Vatner SF, Meininger GA. "Smooth Muscle Cell Stiffness Syndrome"—Revisiting the Structural Basis of Arterial Stiffness. Front Physiol [Internet]. 2015 [cited 2018 Oct 21]; 6. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4649054/

56. Gayda M, Juneau M, Tardif J-C, Harel F, Levesque S, Nigam A. Cardiometabolic and traditional cardiovascular risk factors and their potential impact on macrovascular and microvascular function: preliminary data. Clin Hemorheol Microcirc. 2015; 59: 53–65.

57. Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? Trends Neurosci. 1993; 16: 206–14.

58. Singel DJ, Stamler JS. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. Annu Rev Physiol. 2005; 67: 99–145.

59. Willie CK, Tzeng Y-C, Fisher JA, Ainslie PN. Integrative regulation of human brain blood flow. J Physiol. 2014; 592: 841–59.

60. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Nat Med. 2003; 9: 1498–505.

61. Brooks J. The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen. Proc R Soc Lond B. 1937; 123: 368–82.

62. Shannon OM, Duckworth L, Barlow MJ, Deighton K, Matu J, Williams EL, Woods D, Xie L, Stephan BCM, Siervo M, O'Hara JP. Effects of Dietary Nitrate Supplementation on Physiological Responses, Cognitive Function, and Exercise Performance at Moderate and Very-High Simulated Altitude. Front Physiol. 2017; 8: 401.

63. Masschelein E, Van Thienen R, Wang X, Van Schepdael A, Thomis M, Hespel P. Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. J Appl Physiol Bethesda Md 1985. 2012; 113: 736–45.

64. Shannon OM, McGawley K, Nybäck L, Duckworth L, Barlow MJ, Woods D, Siervo M, O'Hara JP. "Beet-ing" the Mountain: A Review of the Physiological and Performance Effects of Dietary Nitrate Supplementation at Simulated and Terrestrial Altitude. Sports Med Auckl NZ. 2017; 47: 2155–69.

65. Porcelli S, Pugliese L, Rejc E, Pavei G, Bonato M, Montorsi M, La Torre A, Rasica L, Marzorati M. Effects of a Short-Term High-Nitrate Diet on Exercise Performance. Nutrients [Internet]. 2016 [cited 2018 Oct 18]; 8. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037521/

66. Hoon MW, Fornusek C, Chapman PG, Johnson NA. The effect of nitrate supplementation on muscle contraction in healthy adults. Eur J Sport Sci. 2015; 15: 712–9.

67. Haider G, Folland JP. Nitrate supplementation enhances the contractile properties of human skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc. 2014; 46: 2234–43.

68. Fulford J, Winyard PG, Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, Jones AM. Influence of dietary nitrate supplementation on human skeletal muscle metabolism and force production during maximum voluntary contractions. Pflugers Arch. 2013; 465: 517–28.

69. Meirelles CM, Matsuura C. Acute supplementation of L-arginine affects neither strength performance nor nitric oxide production. J Sports Med Phys Fitness. 2018; 58: 216–20.

70. Figueroa A, Wong A, Jaime SJ, Gonzales JU. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2017; 20: 92–8.

71. Jones AM, Thompson C, Wylie LJ, Vanhatalo A. Dietary Nitrate and Physical Performance. Annu Rev Nutr. 2018; 38: 303–28.

72. McMahon NF, Leveritt MD, Pavey TG. The Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Endurance Exercise Performance in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sports Med Auckl NZ. 2017; 47: 735–56.

73. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. Acta Physiol Oxf Engl. 2007; 191: 59–66.

74. Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, Weitzberg E. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. Cell Metab. 2011; 13: 149–59.

75. Wylie LJ, Kelly J, Bailey SJ, Blackwell JR, Skiba PF, Winyard PG, Jeukendrup AE, Vanhatalo A, Jones AM. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. J Appl Physiol. 2013; 115: 325–36.

76. Moinard C, Maccario J, Walrand S, Lasserre V, Marc J, Boirie Y, Cynober L. Arginine behaviour after arginine or citrulline administration in older subjects. Br J Nutr. 2016; 115: 399–404.

77. James PE, Willis GR, Allen JD, Winyard PG, Jones AM. Nitrate pharmacokinetics: Taking note of the difference. Nitric Oxide Biol Chem. 2015; 48: 44–50.

78. Wylie LJ, Ortiz de Zevallos J, Isidore T, Nyman L, Vanhatalo A, Bailey SJ, Jones AM. Dose-dependent effects of dietary nitrate on the oxygen cost of moderate-intensity exercise: Acute vs. chronic supplementation. Nitric Oxide Biol Chem. 2016; 57: 30–9.

79. Richalet J-P, Larmignat P, Poitrine E, Letournel M, Canouï-Poitrine F. Physiological Risk Factors for Severe High-Altitude Illness. Am J Respir Crit Care Med. 2012; 185: 192–8.

80. Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. Structural and genetic bases of arterial stiffness. Hypertens Dallas Tex 1979. 2005; 45: 1050–5.

81. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, Filipovsky J, Huybrechts S, Mattace-Raso FUS, Protogerou AD, Schillaci G, Segers P, Vermeersch S, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. J Hypertens. 2012; 30: 445–8.

82. Pereira T, Maldonado J. Pulse wave analysis reproducibility with the Complior Analyse device: a methodological study. Blood Press Monit. 2018; 23: 164–70.

83. Le Roux-Mallouf T, Vibert F, Doutreleau S, Verges S. Effect of acute nitrate and citrulline supplementation on muscle microvascular response to ischemia-reperfusion in healthy humans. Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab. 2017; 42: 901–8.

84. Lévénez M, Garland SJ, Klass M, Duchateau J. Cortical and spinal modulation of antagonist coactivation during a submaximal fatiguing contraction in humans. J Neurophysiol. 2008; 99: 554–63.

85. Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. Front Psychol [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 6]; 4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840331/

Publication n°4 : Supplémentation chronique et entrainement

Effet d'une supplémentation chronique sur les adaptations à l'entrainement chez le sujet sain en bonne santé.

Nous avons pu rapporter que la supplémentation en précurseur de NO pouvait améliorer la fonction endothéliale dans des conditions spécifiques chez le sujet jeune en bonne santé. La performance à l'effort local d'extension du quadriceps ne semble cependant pas être améliorée. Nous avons vu également que la supplémentation chronique en précurseur de NO améliorait la puissance maximale aérobie chez la personne âgée, en améliorant le rendement énergétique. Ceci suggère un effet potentiel sur les exercices sollicitant le système cardiovasculaire. Bien que l'effet sur l'exercice aigu soit relativement bien décrit, l'intérêt des précurseurs de NO sur les réponses à l'entrainement aérobie et l'entrainement en force n'ont jamais été étudiés. Nous faisons l'hypothèse que la supplémentation en précurseurs de NO pourrait à la fois améliorer la performance à chaque séance d'entrainement, et optimiser la récupération et les adaptations physiologiques. Ainsi, dans la ***publication 4,*** nous avons évalué les effets d'une prise chronique de précurseurs de NO sur les adaptations physiologiques à l'entrainement chez le sujet jeune en bonne santé. Pendant 8 semaines, les participants ont consommés quotidiennement un jus de salade contenant 520 mg de nitrate et 6 g de L-citrulline ou un placebo, et suivi un protocole d'entrainement constitué de 3 séances par semaine. La pression artérielle, la rigidité artérielle, la fonction endothéliale ainsi que la réponse vasculaire à l'hypercapnie et l'hypoxie nous ont permis d'évaluer la fonction vasculaire. La performance à l'exercice a été évaluée par deux tests d'effort incrémentaux jusqu'à épuisement. Le premier était un effort global effectué sur ergocycle, et le deuxième était un effort local d'extension du quadriceps. Toutes ces mesures étaient effectuées au moins 6 heures après la dernière prise du complément pour se focaliser sur les effets chroniques et limiter la part des effets aigus de la supplémentation.

- Publication n°4 –

Effect of chronic nitrate and citrulline supplementation and exercise training in healthy active young individuals

Thibault Le Roux-Mallouf [1], Angela Vallejo [1], Felix Pelen [1], Idir Halimaoui [1], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]

[1] HP2 Laboratory INSERM U1042, Grenoble Alpes University, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.

[2] Sport and Pathologies Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France.

Résumé

Contexte : Les précurseurs de monoxyde d'azote semblent augmenter la biodisponibilité en NO et ainsi améliorer la performance à l'exercice. Cependant, les effets d'une supplémentation chronique sur les réponses physiologique à l'entrainement ont été très peu étudiés. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'effet d'une supplémentation chronique en précurseurs de NO sur les réponses physiologique à un programme d'entrainement de 8 semaines chez le sujet jeune en bonne santé.

Méthode : Vingt-quatre sujets jeunes en bonne santé (12 femmes) ont effectués des évaluations de la fonction vasculaire et deux tests d'effort jusqu'à épuisement (un test d'extension du quadriceps et un test sur ergocycle) avant et après deux mois d'entrainement (en endurance et en force), en parallèle d'une prise quotidienne soit d'un placebo (PLA) soit d'un jus de salade enrichie en nitrate (N+C) contenant 520 mg de nitrate et 6 g de citrulline. Durant toute la durée des exercices, l'oxygénation cérébrale et musculaire a été mesurée par spectroscopie proche infrarouge (NIRS).

Résultats : La supplémentation en N+C a induit une augmentation plus importante de la force maximale volontaire du quadriceps (+5.1 ± 3.5 kg *versus* +0.2 ± 5.5 kg, p=0.008) et une tendance vers une augmentation de l'endurance (+35.2 ± 26.1 contractions *versus* +24.0 ± 10.4 contractions, p=0.092) comparé à la supplémentation en PLA. Aucun effet n'a été rapporté sur les effets de l'entrainement sur les performances aérobie.

Conclusion : Ces résultats suggèrent que la supplémentation chronique en nitrate et citrulline augmente les effets de l'entrainement sur la fonction musculaire du quadriceps chez le sujet sain, sans avoir d'effet sur les performances aérobie sur ergocycle.

Effect of chronic nitrate and citrulline supplementation and exercise training in healthy active young individuals

Thibault Le Roux-Mallouf [1], Angela Vallejo [1], Felix Pelen [1], Idir Halimaoui [1], Stéphane Doutreleau [1,2], Samuel Verges [1,2]

[1] HP2 Laboratory INSERM U1042, Grenoble Alpes University, Jean Roget Building, Faculty of Medicine, F-38042 Grenoble, France.
[2] Sport and Pathologies Unit, Grenoble Alpes University Hospital, Hôpital Michallon, F-38042 Grenoble, France.

Corresponding author:
Dr. Samuel Verges
Laboratoire HP2 (U1042 INSERM), Univ. Grenoble Alpes
UM Sports Pathologies, Hôpital Sud, Avenue Kimberley, 38 434 Echirolles - France
Tel: +33 4 76 76 68 60 - Fax: +33 4 76 76 89 21 - E-mail: sverges@chu-grenoble.fr

Keys words: Nitric oxide, nitrate, citrulline, exercise, older adults.

- What is the central question of this study?

This study aims to assess whether nitrate and citrulline supplementation increases the effect of exercise training on exercise performance in healthy active young individuals.

- What is the main finding and its importance?

The combination of nitrate and citrulline supplementation and exercise training has a larger effect on knee extensor strength but similar effect on cycling performance than exercise training alone.

Abstract

Nitric oxide (NO) precursor supplementation has been shown to increase NO bioavailability and possibly to improve vascular function and exercise performance. It remains unclear whether the combination of NO precursor supplementation and exercise training may have synergic effects on exercise performance. This study aims to assess the effect of chronic nitrate and citrulline intake on exercise training adaptations in healthy young individuals. Twenty-four healthy active young (12 females) performed vascular function assessment (blood pressure, pulse wave velocity and post-ischemia vasodilation) and both local (submaximal isometric unilateral knee extension) and whole-body (incremental cycling) exercise tests to exhaustion before and after a two-month exercise training program and daily intake of a placebo (PLA) or a nitrate-rich salad and citrulline (N+C, 520 mg nitrate and 6 g citrulline) drink. Prefrontal cortex and quadriceps oxygenation was monitored continuously by near-infrared spectroscopy. N+C supplementation had no effect on vascular function and muscle and cerebral oxygenation during both local and whole-body exercise. N+C supplementation induced a significantly larger increase in maximal knee extensor strength (+5.1 ± 3.5 kg *versus* +0.2 ± 5.5 kg, p=0.008) as well as a trend toward a larger increase in knee extensor endurance (+35.2 ± 26.1 *versus* +24.0 ± 10.4 contractions, p=0.092) than PLA, but no effect on exercise training-induced cycling endurance improvement. These results suggest that chronic nitrate and citrulline supplementation enhances the effect of exercise-training on quadriceps muscle function in healthy active young individuals but this does not translate into improved cycling performances.

Keys words: Nitric oxide, nitrate, citrulline, exercise, older adults.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a gaseous signalling molecule involved in a variety of physiological functions throughout the body (Hirst and Robson 2011). The first pathway for NO production is endogenous via the citrulline-arginine-NO pathway requiring the activity of the nitric oxide synthase (NOS) enzymes. The second pathway is exogenous since it uses nitrate and nitrite brought by water and food to produce NO based on the simple one-electron reduction of nitrite. Systemic NO bioavailability can be enhanced by NO precursors supplementation such as arginine (Chin-Dusting, Willems, and Kaye 2007) and nitrate (Jon O. Lundberg and Govoni 2004b). Interestingly, it has been shown that oral citrulline supplementation increases the circulating (Schwedhelm et al. 2008b; Waugh et al. 2001) and tissue (Wijnands et al. 2012) arginine concentration more efficiently than an equivalent dose of arginine, suggesting that exogenous citrulline administration might represent an interesting option to increase the amount of arginine to be converted by NOS in NO.

In the peripheral vessels, NO regulates vascular tone by activating soluble guanylate cyclase in the vascular smooth muscle. During physical activities, NO bioavailability is important to match blood flow to oxygen demand in the brain and contracting muscles. During intermittent handgrip exercise for instance, NOS inhibition via NG-monomethyl-Arginine reduces muscle blood flow (Gilligan et al. 1994) and total vasodilator responses to muscle contraction. Several studies suggest that nitrate supplementation may improve performance in a variety of exercise settings, at least in moderate trained participants (Aucouturier et al. 2015; Cermak, Gibala, and van Loon 2012; Thompson et al. 2015; Porcelli et al. 2015). It has recently been showed that chronic nitrate supplementation may favourably impact the metabolic and contractile properties of skeletal muscle by increase NO bioavailability (Larsen et al. 2011; Haider and Folland 2014). Specifically, the improvements in exercise efficiency and performance may be related to an improvement in the oxygen or adenosine triphosphate (ATP) cost of muscle force or power production (Haider and Folland 2014; Coggan et al. 2015), which might be related to an increased perfusion, mitochondrial (Whitfield et al. 2016) and contractile function (Hernández et al. 2012). Regarding citrulline, besides its ability to increase plasma arginine bioavailability as a substrate for NO synthesis (Schwedhelm et al. 2008b), it could enhance muscle protein resynthesize (Jourdan et al. 2015) and reduce fatigue during exercise by improving ammonia liver elimination (Breuillard, Cynober, and Moinard 2015). However, while these effects have been widely investigated on acute exercise responses, it is less clear how chronic NO precursor supplementation may affect physiological responses to exercise training.

It is possible that similar to the effects of exercise training, elevated NO bioavailability may stimulate angiogenesis (Gavin et al. 2000), mitochondrial biogenesis (Nisoli et al. 2003) and the transformation of muscle fiber phenotype (Smith, Smith, and Criswell 2002) through the activation of regulatory factors such as peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (Roberts et al. 2017). It could also be anticipated that an increase in NO bioavailability following nitrate supplementation by reducing the O_2, ATP and phosphocreatine (PCr) cost of muscle force production (Porcelli et al. 2016b; Fulford et al. 2013) might allow higher training intensity and as a consequence, greater training adaptations. At last, citrulline effects on ammonia homeostasis and muscle protein synthesis (Cynober, de Bandt, and Moinard 2013) could reduce fatigue during exercise, increase exercise training session intensity or duration (Cutrufello, Gadomski, and Zavorsky 2015), and improve muscle recovery and development between sessions.

The effects of both nitrate (Muggeridge et al. 2017; De Smet et al. 2016; Thompson et al. 2017) and citrulline (Figueroa et al. 2015; Devries et al. 2015) daily supplementation during an exercise training program on the physiological and muscle metabolic adaptations to training have received limited attention. Compared with placebo, adding nitrate supplementation to sprint interval training tended to increase peak work rate during incremental exercise and reduce the fatigue index during repeated sprint exercise (Thompson et al. 2017; Muggeridge et al. 2017). This was associated to a reduction in blood lactate concentration, an increased blood pH during intensive exercise and a reduction in the relative proportion of type IIx muscle fibers in the *vastus lateralis* muscle (Thompson et al. 2017; Muggeridge et al. 2017). Regarding citrulline, although no study in human has evaluated its potential synergetic effect with exercise training, studies in rats have shown that its effect on muscle function may be due to its ability to increase plasma amino acid concentration (Breuillard, Cynober, and Moinard 2015), which may be beneficial to exercise training responses.

Thus, this study aims to assess the effect of chronic NO precursor supplementation on strength and endurance exercise training adaptations in healthy young subjects. To enhance NO bioavailability, nitrate and citrulline supplementation were used in order to supplement both NOS-independent and NOS-dependent pathways. We hypothesized that the combination of NO precursor intake and strength and endurance training would increase muscle strength and endurance performance to a larger extent than exercise training alone.

Material and methods

Subjects

Twenty-four subjects (12 females) (age 26 ± 3 years; body mass 67.8 ± 10.4 kg; height 172 ± 10 cm) were enrolled according to the following inclusion criteria: healthy and active (no more than 2 sessions of physical activity at low to moderate intensity per week), age between 18 and 30 years old, body mass index between 18 and 30 $kg \cdot m^{-2}$, non-smokers and no medication (except hormonal treatment). All participants had to be free from any use of food supplements or particular diet. The study was approved by the local ethics committee (CPP Sud-Est V, 2014-A01876-41) and performed according to the Declaration of Helsinki. Subjects were fully informed of the procedure and risks involved and gave their written consent.

Study design

In this double blind, randomized study, after a familiarization session, each participant was tested on four occasions, twice before and twice after two month training program and daily intake of NO precursors or placebo. A recovery period of at least two days separated each experimental session. All tests were performed at least 6 h after the last supplementation to avoid the acute effect of NO precursors. The day before each testing session and on the testing days, subjects were instructed to adhere to their normal living and dietary routines, to avoid caffeine, dehydration or excessive hydration. During the supplementation period, subjects were also instructed to refrain from using any kind of mouth wash. Nutrition and physical activity before and during the protocol were recorded on a diary and controlled by the investigators.

During the first visit, fat-mass (Body analyser scale SC-240, Tanita, Amsterdam, Netherlands), resting arterial blood pressure (Digital Blood Pressure Monitor, A&D Medical, Sydney, Australia) and arterial stiffness as pulse wave velocity (PWV; COMPLIOR device, ALAM Medical, Colson, Les Lilas, France) were measured three times. Then, subjects performed an ischemia-reperfusion test on the lower limb to evaluate the NO dependent vasodilation (see below). Following this evaluation, participants sat in a custom-built chair, with the right knee flexed at 90º and the ankle fixed to a strain gauge (Meiri F2732 200daN; Celians, Montauban, France), and performed an incremental intermittent isometric knee extension test. After a standardized 5-min warm up phase, subjects performed four maximal voluntary contractions (MVC) with 1 min of rest in between and MVC was determined as the highest force peak among the four trials. Then, exercise started at a target force of 35% MVC which was increased by 5% every 4 min. Subjects followed the instructions of a soundtrack to contract (5 s) and relax (4 s) the right quadriceps according to a visual signal displaying the target force level. Task failure

was defined as the inability of the subject to perform three consecutive contractions adequately (*i.e.* if the contraction was not of 5-s duration or if the mean contraction torque was lower than the target torque for >2s). During the knee extension test, cerebral and muscle oxygenation were measured by near infrared spectroscopy (NIRS) (see below).

During the second visit, subjects breathed through a face-mask and were blinded to the inhaled gas mixture composition delivered by an IsoCap-Altitrainer 200® (SMTEC, Nyon, Switzerland). During the initial phase, subjects sat quietly in a semi-recumbent position and inhaled various gas mixtures in order to evaluate cerebrovascular reactivity: first, subjects inhaled a normoxic gas mixture for 5 min (inspiratory oxygen fraction, FiO_2 = 0.21; normoxia); then, they inhaled a normoxic hypercapnic gas mixture ($FiCO_2$ = 0.04-0.07%) individually and continuously adjusted to induce for 5 min an end-tidal partial pressure of CO_2 ($PetCO_2$) 10 mmHg above the initial normoxic $PetCO_2$; after another 5-min normoxic phase, subjects inhaled a hypoxic gas mixture (FiO_2 = 0.12) for 5 min. After these resting measurements, subjects continued to inhale the hypoxic gas mixture (FiO_2 = 0.12) and were installed on a cycle ergometer (Lode® CORIVAL, Groningen, The Netherlands) to start cycling at a constant-load of 90W (males) or 70W (females) for 10 min (hypoxic cycling), followed by another 10-min constant cycling phase at the same workload while inhaling a normoxic gas mixture (normoxic cycling). These two 10-min cycling phases allowed evaluating the cardiovascular exercise hypoxic responses (Richalet et al. 2012). Finally, starting from this initial workload, a maximal incremental cycling test was performed with an increment of 10W for females and 15W for males every minute until volitional exhaustion. Throughout the test, cerebral and muscle oxygenation was measured by NIRS, arterial oxygen saturation was recorded by finger pulse oximetry (Masimo Radical 7, Masimo Corp., Irvine, CA), blood pressure was measured on the right arm with a digital pressure monitor system (Digital Blood Pressure Monitor A&D Medical, Kitamoto-Shi, Japan) and minute ventilation (VE) and gas exchanges (VO_2, VCO_2, $PETCO_2$) were monitored breath-by-breath using a metabolic cart (MetaMax 3B, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Germany). Gas analysers and volume transducers were calibrated prior to each test with a 3-L syringe and references gases, respectively, according to manufacturer's instructions.

These two evaluation visits were repeated identically after the two-month supplementation and training period at least four days after the last training sessions.

NO precursor supplementation

The NO precursor beverage (N+C) was composed of nitrate-rich natural dried salads extract and citrulline. It supplied 520 mg of nitrate (8.6 mmol) and 6 g of citrulline. The placebo beverage (PLA) was composed of nitrate-free cherry tail juice and was of similar colour and taste than the N+C beverage. The two supplements had the same carbohydrate profile. Both the experimenters and the subjects were blinded for the composition of the beverages. After the first initial evaluation visits, subjects were randomized into the N+C or the PLA groups and were asked to drink the beverage every morning until the second testing session.

Training program

The training program lasted for eight weeks with three sessions per week. The duration and intensity of the sessions increased gradually from week 1 to week 8. The first session of the week consisted in high intensity interval training on an ergocycle, with 20-s to 120-s seconds high intensity period at 80% to 100% of maximal aerobic power, with recovery periods at low to moderate intensity. Throughout every session, subjects could choose the target power output. The second session of the week was initially performed on a quadriceps bench where subjects performed several series of 3 to 9 repetitions of knee extensions at 90 to 60% of one maximal repetition. Throughout every session, subjects could adapt the load with the goal to choose a load which made the last repetition of each series very difficult. The second part of the session consisted of different exercises in the form of circuit training composed of 30-s exercise period and 30-s recovery period repeated 18 (first week) to 30 times (last week), including scapular and pelvic girdle muscle exercises. The third session of the week was performed on an ergocycle at different target percentages of the subjects' maximal heart rate (65-85%) for periods from 1 to 9 min. The time spent at 80-85 % of maximal heart rate increased gradually during the training program.

Pulse wave velocity

PWV was analysed with a non-invasive automatic device (COMPLIOR device, ALAM Medical). Arterial stiffness measured by PWV has been shown to be acutely influenced by vascular tone and constitutively released nitric oxide (Laurent, Boutouyrie, and Lacolley 2005). The PWV measurement technique has been described previously elsewhere (Van Bortel et al. 2012; Pereira and Maldonado 2018). Briefly, common carotid artery, femoral artery, pressure waveforms were recorded noninvasively. The pressure waveforms were digitized at the sample acquisition frequency of 500 Hz. A pre-processing system automatically analysed the gain in

each waveform and adjusted it for equality of the 2 signals. When the operator observed a pulse waveform of sufficient quality on the computer screen, digitization was suspended and calculation of the time delay between the 2 pressure upstrokes was initiated. Measurements were repeated over at least 5 different cardiac cycles, and the mean was used for the final analysis. The distance travelled by the pulse wave was measured over the body surface as the distance between the 2 recording sites (D), whereas pulse transit time (t) was automatically determined by the Complior device; PWV was automatically calculated as PWV=D/t, and 80% of this distance defined the pulse wave traveled distance (common carotid artery-common femoral artery × 0.8).

Ischemia-reperfusion test

A pneumatic cuff (Santelec, Cestas,France) was positioned proximally on the right thigh. After completion of a 5-min baseline phase, a rapid arterial occlusion (<30 s) of the right leg was induced by manual inflation of the pneumatic cuff at 250 mmHg. The cuff remained inflated for 5 min. The arterial cuff was rapidly deflated in less than 5 sec to initiate the reperfusion phase. The reperfusion was monitored for 5 min. During the reperfusion phase, kinetics of NIRS signals were recorded to evaluate post-ischemic vasodilation as previously described (Le Roux-Mallouf et al. 2017).

Near infrared spectroscopy (NIRS)

Oxy[HbO_2]-, deoxy[HHb]-, total[HbTot]-hemoglobin concentration and tissue saturation index (TSI) changes were estimated throughout testing sessions over multiple sites using a two-wavelength (780 and 850 nm) multichannel, continuous wave NIRS system (Oxymon MkIII, Artinis Medical Systems, the Netherlands). Quadriceps muscle hemodynamic was assessed from the right *vastus lateralis* using a 4-cm interoptodes distance. Probe holder was secured to the skin using double-sided tape and covered with a black sweatband to shield the optodes from ambient light. Left pre-frontal cortex hemodynamic was assessed between Fp1 and F3 locations according to the international 10–20 EEG system with 3.5-cm interoptodes distance. The probe holders were secured to the skin with double-sided tape and maintained with Velcro headbands. Data were recorded continuously at 10 Hz and filtered with a 1-s width moving Gaussian smoothing algorithm before analysis.

Data analysis

Ischemia-reperfusion NIRS response was characterized by changes in HbTot concentration as a quantitative index of blood volume and by changes in HbO_2 concentrations as a qualitative index of tissue oxygen delivery during the post-ischemia phase. During the reperfusion phase,

the difference between the value at the end of the ischemia phase and the maximal value reached during the reperfusion phase (Δmax/min) represents the lower-limb post-ischemic vascular reactivity. Resting hypercapnia and hypoxia responses were characterized by changes in cardiovascular and cerebrovascular parameters between the initial 5-min normoxic phase and the 5-min hypoxia or 5-min hypercapnia phases (the last 60 s of each phase were used for analysis). Exercise hypoxic responses were characterized by changes in cardiovascular and cerebrovascular parameters between the 10-min normoxic cycling phase and the 10-min hypoxic cycling phase (the last 60 s of each phase were used for analysis). Owing to the between-subject variability in time to task failure during knee extension exercise and incremental cycling test, all data were normalized as a percentage of endurance time (Lévénez et al. 2008). Data from experimental sessions before and after the supplementation period were compared at different time points: i) at 25% (25%), ii) at 50% (50%), iii) 75% (75%), iv) 100% (100%) of the duration of the test performed before the supplementation period, and iv) during the last 30 s of the knee extension exercise or incremental cycling test (exhaustion). Workload during training program was assessed by mean changes in training power during the each aerobic sessions and mean changes in load (kg) during each force development sessions.

Statistical analysis

Power assessment for the primary outcome (exercise performance) was based on a minimum expected NO precursor effect of 10%. Assuming an α level of 5% and power of 80%, 24 subjects were required. Statistical analysis were conducted with n = 24 for all evaluations except for TSI in pre-frontal cortex and quadriceps muscles (n = 23) due to technical issues. Data were analyzed with SPSS v.24 software (SPSS Inc, Chicago, United states). Data from PRE and POST supplementation and training period in each group were compared using two-way (N+C/PLA group × PRE/POST session) ANOVA after establishing that data conformed to a normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test). Least Squares Difference (LSD) post hoc analyses were performed when a significant ANOVA effect was identified. Partial eta square ($p\eta 2$) values are reported as measures of effect size, with moderate and large effects considered for $p\eta 2 \geq 0.07$ and $p\eta 2 \geq 0.14$, respectively (Cohen, 1988). Data were also analyzed as differences between PRE and POST supplementation and training period (ΔPRE/POST). In this case, ΔPRE/POST between the N+C and PLA groups were compared with paired t-test and Cohen's delta (d) determined the effect size and practical significance of N+C effect. Effect sizes were classified as small if $d \leq 0.2$, medium if $d \approx 0.5$,

and large if d ≥ 0.8 (Lakens 2013). For all statistical analyses, a two-tailed > level of 0.05 was used as the cut off for significance. All data are presented as mean values ± SD.

Results

Vascular function and anthropometric adaptations

Resting vascular function and anthropometric parameters are provided in table 1. There was no significant session main effect and no significant group × session interaction on vascular function ($p > 0.05$).

Similarly, there was no significant session main effect or group × session interaction for weight and fat mass (all $p > 0.05$).

		PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
Weight (Kg)	**N+C**	67.3 ± 12.0	67.7 ± 12.0	0.4 ± 1.4	0.262	0.113
	PLA	67.1 ± 8.7	67.2 ± 7.9	0.1 ± 1.3		
Body Fat mass (%)	**N+C**	19.2 ± 4.6	19.6 ± 4.7	0.4 ± 2.2	0.072	0.400
	PLA	21.3 ± 6.6	20.5 ± 6.8	-0.8 ± 1.4		
SBP (mmHg)	**N+C**	112.7 ± 11.1	112.9 ± 10.2	0.2 ± 8.4	0.171	0.395
	PLA	111.8 ± 10.4	108.9 ± 8.1	-2.9 ± 7.1		
DBP (mmHg)	**N+C**	69.7 ± 6.2	67.7 ± 7.1	-2.0 ± 5.0	0.426	0.072
	PLA	71.7 ± 8.1	70.2 ± 9.0	-1.5 ± 8.6		
MBP (mmHg)	**N+C**	84.1 ± 6.5	83.2 ± 7.0	-1.0 ± 7.6	0.323	0.189
	PLA	84.9 ± 7.8	82.6 ± 8.1	-2.4 ± 7.4		
PWV ($m \cdot s^{-1}$)	**N+C**	6.0 ± 1.2	6.8 ± 1.4	0.8 ± 1.0	0.320	0.188
	PLA	6.5 ± 1.9	7.8 ± 3.4	1.3 ± 3.5		
Reperfusion (mmol of HbO_2)	**N+C**	18.5 ± 13.3	19.4 ± 11.3	0.9 ± 3.1	0.301	0.157
	PLA	16.8 ± 9.5	16.1 ± 9.3	-0.7 ± 4.9		
Reperfusion (mmol of Hbtot)	**N+C**	11.2 ± 6.8	10.9 ± 5.4	-0.2 ± 2.9	0.477	0.158
	PLA	10.2 ± 5.1	11.5 ± 3.9	1.3 ± 4.3		

Data are presented as mean ± SD, n = 24. SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; PWV, carotid-femoral pulse wave velocity; Reperfusion, difference between the value reached at the end of the ischemic phase and the maximal value reached during the reperfusion phase in the ischemia-reperfusion test; HbO_2, oxyhaemoglobin; HbTot, total haemoglobin. PRE, measure before the intervention period; POST, measure after the intervention period. N+C, nitrate + citrulline, PLA, placebo; ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 1. Vascular function and anthropometrics parameters before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation.

Hypercapnic and hypoxic responses

As shown in table 2, there was no significant session main effect and no significant group x session interaction on hypercapnic responses at rest (all $p > 0.05$). As shown in table 3, there was also no significant session main effect and no significant group x session interaction on hypoxic responses, neither at rest nor during submaximal cycling exercise (all $p > 0.05$).

			PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
ΔHR (bpm)		N+C	4.2 ± 4.4	3.1 ± 6.8	-1.1 ± 6.7	0.189	0.376
		PLA	6.6 ± 6.5	3.2 ± 3.0	-3.5 ± 5.8		
ΔVE ($l \cdot min^{-1}$)		N+C	20.0 ± 6.1	21.6 ± 5.8	1.5 ± 5.6	0.488	0.010
		PLA	19.7 ± 7.8	21.2 ± 7.8	1.5 ± 7.6		
ΔTSI %	Cerebral	N+C	4.0 ± 1.8	5.1 ± 5.7	1.2 ± 6.6	0.347	1.070
		PLA	1.2 ± 3.1	4.5 ± 14.1	3.3 ± 14.5		
	Muscle	N+C	2.5 ± 4.1	0.8 ± 1.1	-1.7 ± 4.4	0.482	0.444
		PLA	1.5 ± 3.0	-0.1 ± 1.9	-1.6 ± 4.0		

Data are presented as mean ± SD, n = 24 (n = 23 for TSI). Hypercapnia corresponded to a CO_2 end tidal partial pressure of +10 mmHg above normoxic level; ΔHR, Heart rate difference between normoxia and hypercapnia; ΔVE, minute ventilation difference between normoxia and hypercapnia; ΔTSI, tissue saturation index difference between normoxia and hypercapnia; N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the intervention period; POST, measure after the intervention period. ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 2. Cardiorespiratory, cerebral and muscle responses to hypercapnia before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation.

Incremental cycling test

There was a significant session main effect (training effect) on maximal power output and VO_2 ($p < 0.001$) but not on maximal heart rate (table 5, figure 2). There was no significant group x session interaction on maximal power output, VO_2 and heart rate during the cycling test ($p > 0.05$, table 5). Figure 2 shows heart rate and VO_2 kinetics during the cycling test. There was no significant group x session interaction on heart rate and VO_2 (all $p > 0.05$; figure 2, table 5) nor on submaximal and maximal VE (results not shown; all $p > 0.05$). There was also no significant group x session interaction for TSI (table 4) and all other NIRS parameters (results not shown; all $p > 0.05$) during cycling.

				PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
Rest	ΔHR (bpm)		N+C	9.8 ± 8.3	13.3 ± 6.1	3.5 ± 7.7	0.423	0.081
			PLA	9.3 ± 7.1	12.2 ± 6.4	2.9 ± 6.8		
	ΔVE (l·min^{-1})		N+C	1.4 ± 1.8	-1.5 ± 7.3	-2.9 ± 7.8	0.182	0.388
			PLA	2.0 ± 5.8	1.8 ± 1.2	-0.2 ± 6.1		
	ΔSpO_2 (%)		N+C	86.2 ± 4.9	84.3 ± 4.8	-1.8 ± 5.7	0.219	0.330
			PLA	85.5 ± 3.5	85.4 ± 4.5	-0.1 ± 4.8		
	ΔTSI %	Cerebral	N+C	-4.4 ± 2.6	-6.4 ± 7.5	-2.0 ± 7.6	0.118	0.813
			PLA	-3.8 ± 1.7	-1.0 ± 4.5	2.8 ± 5.7		
		Muscle	N+C	-1.4 ± 1.9	-1.8 ± 1.5	-0.4 ± 1.5	0.083	0.887
			PLA	-1.5 ± 1.7	-0.6 ± 0.6	0.9 ± 1.2		
Cycling	ΔHR (bpm)		N+C	13.0 ± 8.1	24.1 ± 8.4	9.1 ± 10.9	0.112	0.510
			PLA	14.9 ± 7.4	19.1 ± 7.1	4.2 ± 7.9		
	ΔVE (l·min^{-1})		N+C	4.5 ± 5.9	12.4 ± 6.5	6.4 ± 8.0	0.118	0.521
			PLA	5.1 ± 4.7	7.8 ± 4.0	2.7 ± 5.7		
	ΔSpO_2 (%)		N+C	71.8 ± 8.6	67.8 ± 6.7	3.9 ± 10.5	0.345	0.169
			PLA	76.7 ± 8.3	71.1 ± 6.0	5.6 ± 9.8		
	ΔTSI %	Cerebral	N+C	-8.5 ± 7.9	-5.9 ± 10.4	2.6 ± 13.0	0.300	0.037
			PLA	-8.6 ± 6.1	-2.2 ± 5.9	6.4 ± 9.0		
		Muscle	N+C	-3.8 ± 3.2	-6.6 ± 3.4	-2.9 ± 5.6	0.108	0.068
			PLA	-4.2 ± 4.6	-3.3 ± 4.9	1.0 ± 1.4		

Data are presented as mean ± SD, n = 24 (n = 23 for TSI). Hypoxia corresponded to an inspired fraction of oxygen of 11%. ΔHR, heart rate difference between normoxia and hypoxia; ΔVE, ventilation difference between normoxia and hypoxia; ΔSpO_2, pulse oxygen saturation difference between normoxia and hypoxia; ΔTSI, tissue saturation index difference between normoxia and hypoxia; PRE, measure before the intervention period; POST, measure after the intervention period; N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 3. Cardiorespiratory, cerebral and muscle responses to hypoxia at rest and during cycling exercise before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation.

Knee extension exercise performance

There was a significant group x session interaction for MVC ($p < 0.05$, table 5). The PRE-POST increase in MVC was larger in the N+C group compared to PLA. There was a trend towards to a significant group x session interaction for the total number of contractions ($p = 0.092$, table 5). The PRE-POST increase in the number of contractions tended to be larger in the N+C group compared to PLA. There was no significant group x session interaction for TSI (table 4) and all other NIRS parameters (results not shown; all $p > 0.05$) during knee extensions.

Workload during training program

As shown in figure 3, there was no difference between groups regarding the cycling power output (session 1) and the load during bench press exercise (session 2) throughout the training program (all p > 0.05).

			PRE		POST	
			50%	Exhaustion	50%	Exhaustion
Cycling	Cerebral	N+C	0.2 ± 4.9	-2.9 ± 8.4	-0.6 ± 4.4	-8.3 ± 4.2
		PLA	1.1 ± 13.0	-1.3 ± 14.8	2.8 ± 19.5	-0.3 ± 18.0
	Muscle	N+C	-3.1 ± 3.6	-2.6 ± 5.4	-2.8 ± 1.6	-6.4 ± 3.4
		PLA	-1.0 ± 2.1	-0.2 ± 7.5	2.6 ± 14.7	1.0 ± 15.0
Knee extension	Cerebral	N+C	1.0 ± 2.9	-1.3 ± 2.8	-1.7 ± 3.1	-4.3 ± 7.1
		PLA	0.4 ± 2.9	-0.9 ± 1.3	-3.0 ± 3.6	-4.1 ± 4.8
	Muscle	N+C	-16.4 ± 9.2	-17.2 ± 10.1	-13.7 ± 7.3	-17.0 ± 9.6
		PLA	-14.3 ± 10.5	-13.1 ± 11.1	-12.1 ± 6.6	-10.1 ± 9.8

Data are presented as mean ± SD changes of tissue saturation index in % from the initial workload (70W for males and 50W for females), n = 23. N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the intervention period; POST, measure after the intervention period; 50%, 50% of the duration of the PRE test (i.e. isowatt for cycling exercise and isoKg for knee extension exercise).

Table 4. Tissue saturation index during the cycling test and knee extension test before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation.

		PRE	POST	ΔPRE/POST	pΔ	DΔ
Maximal power output (W)	N+C	246.3 ± 72.0	271.6 ± 71.3	25.3 ± 15.5	0.286	0.231
	PLA	241.5 ± 69.5	263.5 ± 68.8	21.9 ± 12.3		
VO_2 ($ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$)	N+C	52.4 ± 8.8	57.8 ± 7.1	5.4 ± 4.1	0.168	0.400
	PLA	50.4 ± 7.4	54.0 ± 6.1	3.6 ± 4.4		
MVC (Kg)	N+C	81.5 ± 19.7	86.6 ± 19.3	5.1 ± 3.5	0.008	1.057
	PLA	67.3 ± 9.7	67.5 ± 12.3	0.2 ± 5.5		
ndurance (number of contractions)	N+C	131.5 ± 46.3	166.7 ± 50.6	35.2 ± 26.1	0.092	0.562
	PLA	126.9 ± 14.5	150.9 ± 15.2	24.0 ± 10.4		

Data are presented as mean ± SD, n = 24. MVC, maximal voluntary contraction; VO_2max, maximal oxygen consumption; N+C, nitrate + citrulline, PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; ΔPRE/POST, difference between PRE and POST measures; pΔ, p value for ΔPRE/POST group comparison; DΔ, Cohen's d effect size of N+C supplementation on ΔPRE/POST.

Table 5. Performances during the cycling test and the knee extension test before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation.

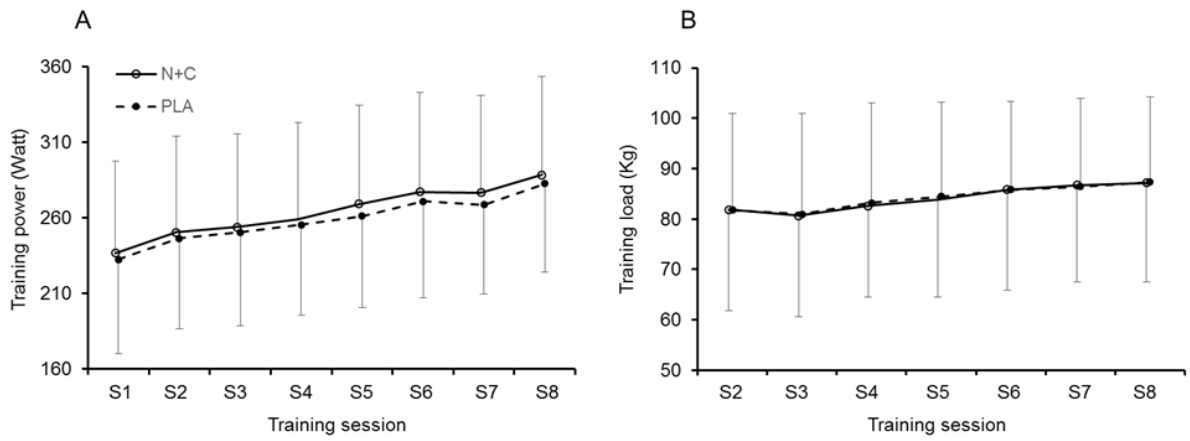


Figure 1. Mean changes in training power output during high intensity interval training on ergocycle (panel A) and strength training load (panel B) during each training sessions (S) of the exercise training program for the placebo (PLA) or the nitrate and citrulline (N+C)groups; n=24.

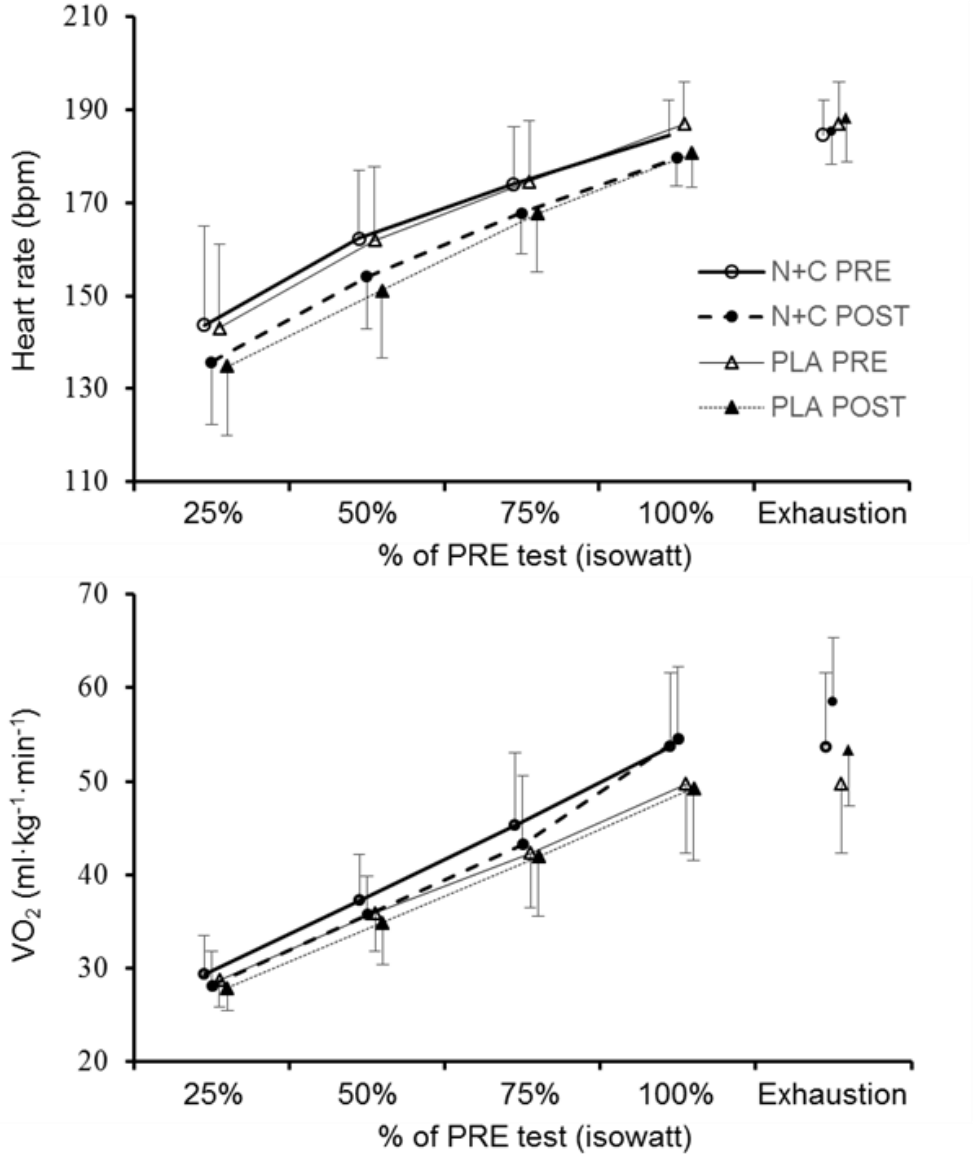


Figure 2. Heart rate and oxygen consumption during the cycling incremental test before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation in healthy young individuals. HR, heart rate; VO_2, oxygen consumption; N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; 25%; 50%; 75%; 100%, 25%, 50%, 75% and 100%, of the duration of the PRE test (*i.e.* isowatt).

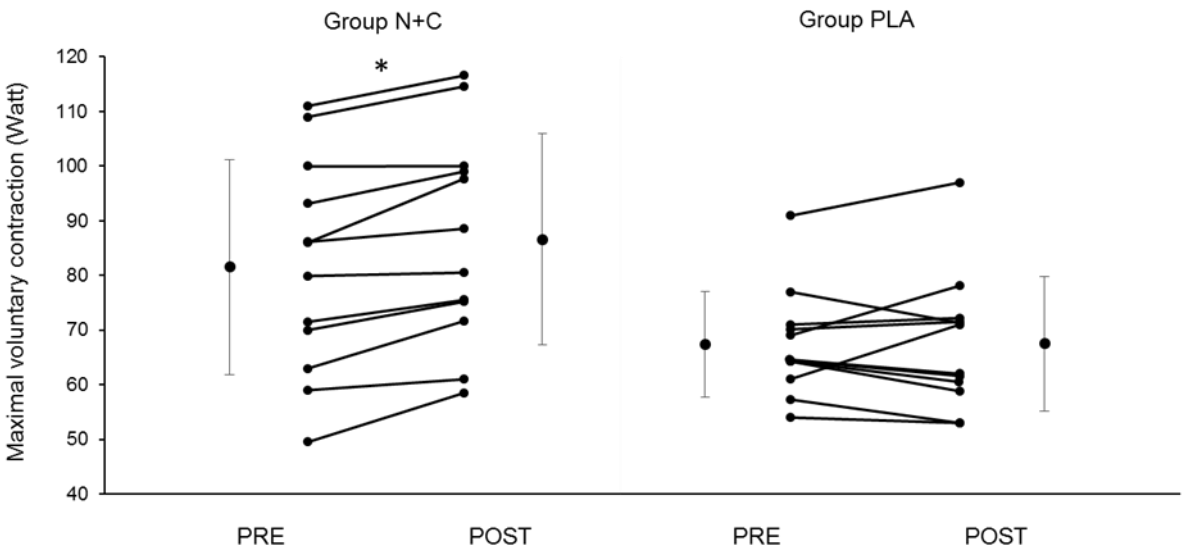


Figure 3. Individual and group mean changes in maximal voluntary contraction before and after two month of exercise training and daily NO precursor supplementation in healthy young individuals. N+C, nitrate + citrulline; PLA, placebo; PRE, measure before the supplementation period; POST, measure after the supplementation period; n=24.

Discussion

This study aims to assess the effect of chronic NO precursor supplementation on strength and endurance training adaptations in healthy young individuals. The main results are that, in healthy young individuals, exercise training and chronic NO precursor ingestion i) had no synergic effect on vascular function and muscle and cerebral oxygenation during exercise, ii) increased maximal voluntary contraction and the total number of contractions (p=0.09) during knee extension exercise to a greater extent compared to exercise training and PLA intake, iii) increased maximal power output and maximal VO_2 during cycling to a similar extent than exercise training and PLA intake. Taken together, our findings suggest that, in healthy young individuals, two-month supplementation of both NOS-independent and NOS-dependent pathways with nitrate and citrulline enhances the effect of exercise training on some aspects of quadriceps muscle function but not on cycling performances.

Vascular function

While previous studies found concomitant positive effect on PWV and blood pressure in healthy subjects following both NO precursor supplementation (Bahra et al. 2012) and exercise training (Sardeli, Gáspari, and Chacon-Mikahil 2018), eight weeks of exercise training and daily nitrate and citrulline intake had no effect on blood pressure and PWV in the present study. There are several possible explanations for these contrasting results. The effect of both exercise training (Zago et al. 2010; Kuru et al. 2009) and NO precursor supplementation (Lundberg, Carlström, and Weitzberg 2018) on vascular function could be due at least in part to enhanced systemic NO bioavailability. It is possible that in healthy active young individuals with normal initial blood pressure, exercise training increases already optimally NO bioavailability at the vascular level and that further increase does not induce additional vascular effect. In addition, the ability to detect relatively small effect of acute NO precursor ingestion on blood pressure or PWV may be limited by between-days physiological and technical variability in a relatively small sample of healthy subjects.

Numerous studies (Jackson et al. 2018) have assessed the effect of NO precursor intake on the endothelial function assessed by post-ischemic vasodilatation. Nitrate intake appears to improve post-ischemic vasodilation following both acute and chronic supplementation in healthy adults (Heiss et al. 2012). We have previously shown that compared to placebo, acute nitrate and citrulline intake led to greater post-ischemic vasodilation in healthy young subjects (Le Roux-Mallouf et al. 2017). Since the nitrate-nitrite-NO pathway contributes to NO production especially under hypoxic conditions (Jon O. Lundberg, Weitzberg, and Gladwin

2008), ischemic conditions may be particularly prone to show the positive effect of nitrate supplementation. Conversely, endothelial function remained unchanged following acute or chronic (~7 days) intake of citrulline in healthy subjects, despite significantly increased plasma concentration of arginine and increased urinary nitrate/nitrite (Churchward-Venne et al. 2014; I.-Y. Kim et al. 2015; Schwedhelm et al. 2008b). Compared to most previous studies having used Doppler ultrasound, it should be noted that the present study assessed the post-ischemic vascular responses by using NIRS, which evaluates the microvasculature and provides an indirect, semi-quantitative measure of blood flow. Another potential reason for the lack of improvement in ischemia-reperfusion responses in the present study is the time delay between the last NO precursor intake and the POST testing session (*i.e.* >6 h) which is in contrast to most previous studies having assessed the effect of acute and chronic NO precursor intake within some hours after the last NO precursor intake (see below). At last, the lack of effect of NO precursor supplementation but also of exercise training on PWV and blood pressure may indicate that NO bioavailability and arterial stiffness and blood pressure, were already optimal in healthy active young adults.

Hypercapnic and hypoxic responses

To our knowledge, this is the first study assessing the effect of NO precursor intake on hypercapnic cardiorespiratory and cerebral responses. Conversely, aerobic exercise training has been previously shown to increase hypercapnic cerebrovascular reactivity (Murrell et al. 2013). Hypercapnia led as expected to an increase in heart rate, VE and cerebral oxygenation measured by NIRS, but these increases were not influenced by neither exercise training nor NO precursor intake. Similar to hypercapnic responses, exercise training and chronic nitrate and citrulline supplementation had no effect on hypoxic cardiorespiratory and tissue oxygenation responses, both at rest and during submaximal cycling exercise. Since NOS-independent NO synthesis is facilitated by the presence of deoxyhaemoglobin (Brooks, 1937; Cosby et al., 2003), it has been postulated that an upregulation of the nitrate-nitrite-NO pathway could increase blood flow where O_2 supply is limited (Lundberg et al., 2008). While Shannon et al. (2017) have shown that acute chronic nitrate intake increased arterial oxygen saturation and cerebral but not muscle oxygenation during exercise at 4300 m, (Masschelein et al. 2012b) have shown that chronic nitrate intake increased muscle but no cerebral oxygenation during exercise at 5000 m. Cerebrovascular vasodilatation in response to hypercapnia and hypoxia is, at least in part, dependent upon NO bioavailability (Peebles et al. 2007) which has been reported to increase

with exercise training (Green et al. 2004). Exercise training has also been shown to increase systemic endothelium-dependent vasodilatation (*i.e.* a NO-mediated response) (Green et al. 2004; Tinken et al. 2008). Furthermore, a link between the systemic endothelial function and cerebrovascular reactivity has been established (Ainslie et al. 2007; Lavi et al. 2003), indicating that any improvements in systemic vascular function might also be reflected in the cerebral circulation. The lack of effect of exercise training and NO precursors on cerebrovascular response to hypercapnia and hypoxia is consistent with the unchanged systemic vascular function in the present study. It can be suggested that healthy young active subjects have already optimal NO bioavailability regarding their resting vascular function and therefore do not benefit from NO precursor supplementation in terms of systemic and cerebral vascular function.

Cycling exercise test

We observed no significant impact of N+C supplementation on exercise training-induced improvement in cycling exercise responses. Eight weeks of exercise training led to an increase of maximal aerobic capacities as shown by the larger maximal power output and maximal VO_2, and to a decrease in submaximal heart rate and VO_2, but these changes were not influenced by NO precursor intake. Similarly, muscle and cerebral oxygenation assessed by NIRS during exercise was not altered by nitrate and citrulline intake. Numerous studies showed a significant improvement in exercise performance following citrulline (Figueroa et al. 2017) or nitrate (A. M. Jones et al. 2018; McMahon, Leveritt, and Pavey 2017) intake in healthy adults while an improvement in O_2 cost during exercise has also been reported after chronic nitrate intake (F. J. Larsen et al. 2007). Since NO precursor intake can increase acute exercise performances, it has been postulated that increasing NO bioavailability during an exercise training program may increase the tolerated workload (intensity, duration) during each session and consequently lead to greater physiological training adaptations. In the present study, N+C intake every morning had no effect on self-adjusted exercise power output during high intensity ergocycle training sessions. Hence, the similar workload throughout the training program could explain the similar training adaptations between groups. Two studies have investigated the effect of nitrate intake on sprint interval training adaptations (Muggeridge et al. 2017; Thompson et al. 2017) and have shown larger pre-post training increase in performance in the supplemented group compared to the placebo group. The mean power output during training sessions was not reported however. The positive effect of nitrate supplementation was observed on submaximal VO_2, metabolic muscle perturbations (Thompson et al. 2017) and maximal peak work rate during sprint interval sessions (Muggeridge et al. 2017) and during incremental exercise (Thompson et al. 2017).

However, in these two studies, the nitrate supplementation effect may be due to the last dose of nitrate ingested before the post-intervention evaluation session. In both Thompson et al. (2017) and Muggeridge et al. (2017) studies, the improved exercise performances were observed 2.5 hours after the last nitrate intake (and as early as the second week of intervention), but not on incremental exercise test performed next day without nitrate intake. In the present study, POST testing sessions were performed at least 6 h after the last NO precursor intake to focus on the chronic effect of the supplementation. Hence, the present study suggests that nitrate and citrulline supplementation for 8 weeks does not induce long lasting changes in cycling responses, *i.e.* > 6 h after the last NO precursor intake.

Knee extension test

Nitrate and citrulline supplementation led to a larger increase in maximal quadriceps strength and endurance (non-significant larger increase in total number of contractions until exhaustion). Since increasing NO bioavailability may improve muscle contractility due to an improved ATP resynthesis or contraction-ATP cost reduction (Haider and Folland 2014), it could be suggested that the larger maximal quadriceps strength increase in the N+C group was due to higher individually adjusted load during the strength training sessions. However, similar to the aerobic exercise sessions, the load during strength training sessions was similar between groups. Previous studies suggested that NO precursor supplementation could improve muscle contractility by increasing intracellular calcium release by sarcoplasmic reticulum (Hernández et al. 2012), muscle plasticity (Roberts et al. 2017; De Smet et al. 2016) and muscle protein resynthesis (Paddon-Jones, Børsheim, and Wolfe 2004; Goron et al. 2017), and as a consequence increase exercise training responses. In rat muscle and myotubes *in vitro*, nitrate intake induces over expression of the transcriptional regulator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC1α) that coordinates the exercise-stimulated skeletal muscle fiber-type switch from glycolytic fast-twitch (type IIb) to oxidative slow-twitch (type I) and intermediate (type IIa) fibers (Roberts et al. 2017). This is consistent with studies in human showing that chronic nitrate intake reduces the proportion of type IIx muscle fibers in the *vastus lateralis* muscle (Thompson et al. 2017; De Smet et al. 2016). In rodents, citrulline intake is able to modulate nitrogen homeostasis (Breuillard, Cynober, and Moinard 2015) and to increase muscle protein synthesis (Osowska et al. 2006) and maximal tetanic muscle strength (Faure et al. 2012). Citrulline may be effective through direct action on muscle protein synthesis signalling pathways (Le Plénier et al. 2017) or by increasing arginine bioavailability (Zajac et al. 2010; Paddon-Jones, Børsheim, and Wolfe 2004). Hence, several metabolic, contractile and

structural mechanisms may underlie the positive effect of N+C intake on muscle function training adaptations leading to an increase in both muscle strength and endurance as suggested in the present study for the knee extensors.

Methodological consideration

Blood concentrations of citrulline and nitrate were not assessed in the present study. Nevertheless, previous studies have reported significant increases in blood concentrations of NO metabolites or citrulline after similar nitrate or citrulline acute and chronic supplementations (Schwedhelm et al. 2008, Wylie et al. 2013). However, the issue of increased NO bioavailability is important to consider regarding the delay between the last NO precursor intake and the post-intervention testing sessions. In contrast to several studies that assessed subjects on average 2 to 3 h after the last nitrate or citrulline intake, in the present study all tests were performed at least 6 h after the last NO precursor intake to avoid the acute effect of the supplementation but instead to focus on the chronic, long-lasting (*i.e.* beyond the acute effect of one single dose of NO precursor) effect of the supplementation. Pharmacokinetics studies have shown that blood nitrite reaches a peak 2 to 3 h after nitrate supplementation before progressively returning to baseline values 5 to 6 h after intake (James et al. 2015). This plasma nitrite kinetic following acute nitrate intake remains similar after chronic nitrate supplementation (Wylie et al. 2016). After citrulline intake, plasma arginine concentration shows similar kinetic with maximum values reached after on average 2.3 h, followed by a progressive decrease without reaching baseline values after 8 h (Moinard et al. 2016). Similarly, this kinetic following acute citrulline intake remains similar after chronic supplementation (Moinard et al. 2016; Schwedhelm et al. 2008b). Hence, in the present study, NO bioavailability during the post-supplementation testing session (at least 6 h after the last intake) may have been lower than in previous studies having assessed the effect of chronic NO precursor supplementation within 2-3 h after the last intake. This could account for the absence of significant effects on the vascular function compared to previous studies (Siervo et al. 2013b). Conversely, the significant effect of NO precursors on muscle function training adaptations indicates that chronic N+C supplementation in healthy young individuals induces positive outcomes due to mechanisms beyond those induced by acute NO precursor intake, e.g. a permanent increase in NO bioavailability and/or changes in muscle metabolic or contractile efficiency.

One should also consider the time delay between the NO precursor intake and the training sessions. In present study, NO precursor intake was performed every morning, while most

training session were performed at mid-day or later in the afternoon, so 4 to 7 hours after the supplementation. It may be suggested that NO precursor intake may have greater effect on exercise training responses when consumed prior to (within 2 h for instance) each training session.

Conclusion

The present study shows a synergistic effect of 8 weeks of training program and daily nitrate and citrulline supplementation on quadriceps muscle function (especially on maximal voluntary contraction). This was associated with no change in vascular function and cycling endurance performance. Hence, this study suggests that chronic supplementation of NOS-dependent and independent NO production pathways in young healthy active subjects may accentuate some of the muscle adaptations induced by a strength and endurance exercise training program. Further studies should focus on the impact of the time delay between NO precursor intake and exercise training/testing sessions regarding the expected improvements in muscle function and exercise performance.

Acknowledgment. We thank all the subjects for participating in the study as well as the staff of the Sport and Pathologies Unit of the Grenoble Alpes Hospital for technical assistance.

Conflicts of interest. The authors report no conflicts of interest associated with this manuscript.

Funding. This work was funded by Fitness-Boutique©.

References

Ainslie, Philip N., Carissa Murrell, Karen Peebles, Marianne Swart, Margot A. Skinner, Michael J. A. Williams, and Robin D. Taylor. 2007. "Early Morning Impairment in Cerebral Autoregulation and Cerebrovascular CO_2 Reactivity in Healthy Humans: Relation to Endothelial Function." Experimental Physiology 92 (4): 769–77. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.036814.

Aucouturier, Julien, Julien Boissière, Mehdi Pawlak-Chaouch, Grégory Cuvelier, and François-Xavier Gamelin. 2015. "Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Tolerance to Supramaximal Intensity Intermittent Exercise." Nitric Oxide: Biology and Chemistry 49 (September): 16–25. https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.05.004.

Bahra, M., V. Kapil, V. Pearl, S. Ghosh, and A. Ahluwalia. 2012. "Inorganic Nitrate Ingestion Improves Vascular Compliance but Does Not Alter Flow-Mediated Dilatation in Healthy Volunteers." Nitric Oxide: Biology and Chemistry 26 (4): 197–202. https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.01.004.

Breuillard, C., L. Cynober, and C. Moinard. 2015. "Citrulline and Nitrogen Homeostasis: An Overview." Amino Acids 47 (4): 685–91. https://doi.org/10.1007/s00726-015-1932-2.

Cermak, Naomi M., Martin J. Gibala, and Luc J. C. van Loon. 2012. "Nitrate Supplementation's Improvement of 10-Km Time-Trial Performance in Trained Cyclists." International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism 22 (1): 64–71.

Chin-Dusting, J. P. F., L. Willems, and D. M. Kaye. 2007. "L-Arginine Transporters in Cardiovascular Disease: A Novel Therapeutic Target." Pharmacology & Therapeutics 116 (3): 428–36. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.001.

Churchward-Venne, Tyler A., Lisa M. Cotie, Maureen J. MacDonald, Cameron J. Mitchell, Todd Prior, Steven K. Baker, and Stuart M. Phillips. 2014. "Citrulline Does Not Enhance Blood Flow, Microvascular Circulation, or Myofibrillar Protein Synthesis in Elderly Men at Rest or Following Exercise." American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism 307 (1): E71-83. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00096.2014.

Coggan, Andrew R., Joshua L. Leibowitz, Ana Kadkhodayan, Deepak P. Thomas, Sujata Ramamurthy, Catherine Anderson Spearie, Suzanne Waller, Marsha Farmer, and Linda R. Peterson. 2015. "Effect of Acute Dietary Nitrate Intake on Maximal Knee Extensor Speed and Power in Healthy Men and Women." Nitric Oxide: Biology and Chemistry 48 (August): 16–21. https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.08.014.

Connes, Philippe, Michael J. Simmonds, Jean-Frederic Brun, and Oguz K. Baskurt. 2013. "Exercise Hemorheology: Classical Data, Recent Findings and Unresolved Issues." Clinical Hemorheology and Microcirculation 53 (1–2): 187–99. https://doi.org/10.3233/CH-2012-1643.

Cutrufello, Paul T., Stephen J. Gadomski, and Gerald S. Zavorsky. 2015. "The Effect of L-Citrulline and Watermelon Juice Supplementation on Anaerobic and Aerobic Exercise Performance." Journal of Sports Sciences 33 (14): 1459–66. https://doi.org/10.1080/02640414.2014.990495.

Cynober, Luc, Jean-Pascal de Bandt, and Christophe Moinard. 2013. "Leucine and Citrulline: Two Major Regulators of Protein Turnover." World Review of Nutrition and Dietetics 105: 97–105. https://doi.org/10.1159/000341278.

De Smet, Stefan, Ruud Van Thienen, Louise Deldicque, Ruth James, Craig Sale, David J. Bishop, and Peter Hespel. 2016. "Nitrate Intake Promotes Shift in Muscle Fiber Type Composition during Sprint Interval Training in Hypoxia." Frontiers in Physiology 7: 233. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00233.

Devries, Michaela C., Leigh Breen, Mark Von Allmen, Maureen J. MacDonald, Daniel R. Moore, Elizabeth A. Offord, Marie-Noëlle Horcajada, Denis Breuillé, and Stuart M. Phillips. 2015. "Low-Load Resistance Training during Step-Reduction Attenuates Declines in Muscle Mass and Strength

and Enhances Anabolic Sensitivity in Older Men." Physiological Reports 3 (8). https://doi.org/10.14814/phy2.12493.

Faure, Cécile, Agathe Raynaud-Simon, Arnaud Ferry, Valérie Daugé, Luc Cynober, Christian Aussel, and Christophe Moinard. 2012. "Leucine and Citrulline Modulate Muscle Function in Malnourished Aged Rats." Amino Acids 42 (4): 1425–33. https://doi.org/10.1007/s00726-011-0841-2.

Figueroa, Arturo, Stacey Alvarez-Alvarado, Michael J. Ormsbee, Takudzwa A. Madzima, Jeremiah C. Campbell, and Alexei Wong. 2015. "Impact of L-Citrulline Supplementation and Whole-Body Vibration Training on Arterial Stiffness and Leg Muscle Function in Obese Postmenopausal Women with High Blood Pressure." Experimental Gerontology 63 (March): 35–40. https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.01.046.

Figueroa, Arturo, Alexei Wong, Salvador J. Jaime, and Joaquin U. Gonzales. 2017. "Influence of L-Citrulline and Watermelon Supplementation on Vascular Function and Exercise Performance." Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 20 (1): 92–98. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000340.

Fulford, Jonathan, Paul G. Winyard, Anni Vanhatalo, Stephen J. Bailey, Jamie R. Blackwell, and Andrew M. Jones. 2013. "Influence of Dietary Nitrate Supplementation on Human Skeletal Muscle Metabolism and Force Production during Maximum Voluntary Contractions." Pflugers Archiv: European Journal of Physiology 465 (4): 517–28. https://doi.org/10.1007/s00424-013-1220-5.

Gavin, T. P., D. A. Spector, H. Wagner, E. C. Breen, and P. D. Wagner. 2000. "Nitric Oxide Synthase Inhibition Attenuates the Skeletal Muscle VEGF MRNA Response to Exercise." Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 88 (4): 1192–98. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1192.

Gilligan, D. M., J. A. Panza, C. M. Kilcoyne, M. A. Waclawiw, P. R. Casino, and A. A. Quyyumi. 1994. "Contribution of Endothelium-Derived Nitric Oxide to Exercise-Induced Vasodilation." Circulation 90 (6): 2853–58.

Goron, Arthur, Frédéric Lamarche, Valérie Cunin, Hervé Dubouchaud, Christophe Hourdé, Philippe Noirez, Christelle Corne, et al. 2017. "Synergistic Effects of Citrulline Supplementation and Exercise on Performance in Male Rats: Evidence for Implication of Protein and Energy Metabolisms." Clinical Science (London, England: 1979) 131 (8): 775–90. https://doi.org/10.1042/CS20170088.

Green, Daniel J., Andrew Maiorana, Gerry O'Driscoll, and Roger Taylor. 2004. "Effect of Exercise Training on Endothelium-Derived Nitric Oxide Function in Humans." The Journal of Physiology 561 (Pt 1): 1–25. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068197.

Haider, Georg, and Jonathan P. Folland. 2014. "Nitrate Supplementation Enhances the Contractile Properties of Human Skeletal Muscle." Medicine and Science in Sports and Exercise 46 (12): 2234–43. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000351.

Heiss, Christian, Christian Meyer, Matthias Totzeck, Ulrike B. Hendgen-Cotta, Yvonne Heinen, Peter Luedike, Stefanie Keymel, et al. 2012. "Dietary Inorganic Nitrate Mobilizes Circulating Angiogenic Cells." Free Radical Biology & Medicine 52 (9): 1767–72. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.051.

Hernández, Andrés, Tomas A Schiffer, Niklas Ivarsson, Arthur J Cheng, Joseph D Bruton, Jon O Lundberg, Eddie Weitzberg, and Håkan Westerblad. 2012. "Dietary Nitrate Increases Tetanic [Ca2+]i and Contractile Force in Mouse Fast-Twitch Muscle." The Journal of Physiology 590 (Pt 15): 3575–83. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.232777.

Hirst, David G., and Tracy Robson. 2011. "Nitric Oxide Physiology and Pathology." Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 704: 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-964-2_1.

Jackson, Jacklyn K., Amanda J. Patterson, Lesley K. MacDonald-Wicks, Christopher Oldmeadow, and Mark A. McEvoy. 2018. "The Role of Inorganic Nitrate and Nitrite in Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Human Evidence." Nutrition Reviews 76 (5): 348–71. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy005.

Jones, Andrew M., Christopher Thompson, Lee J. Wylie, and Anni Vanhatalo. 2018. "Dietary Nitrate and Physical Performance." Annual Review of Nutrition 38 (1): 303–28. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051622.

Jourdan, Marion, K. Sreekumaran Nair, Rickey E. Carter, Jill Schimke, G. Charles Ford, Julie Marc, Christian Aussel, and Luc Cynober. 2015. "Citrulline Stimulates Muscle Protein Synthesis in the Post-Absorptive State in Healthy People Fed a Low-Protein Diet - A Pilot Study." Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland) 34 (3): 449–56. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.04.019.

Kim, Il-Young, Scott E. Schutzler, Amy Schrader, Horace J. Spencer, Gohar Azhar, Nicolaas E. P. Deutz, and Robert R. Wolfe. 2015. "Acute Ingestion of Citrulline Stimulates Nitric Oxide Synthesis but Does Not Increase Blood Flow in Healthy Young and Older Adults with Heart Failure." American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism 309 (11): E915-924. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00339.2015.

Kleiser, S., S. Hyttel-Sorensen, G. Greisen, and M. Wolf. 2016. "Comparison of Near-Infrared Oximeters in a Liquid Optical Phantom with Varying Intralipid and Blood Content." Advances in Experimental Medicine and Biology 876: 413–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3023-4_52.

Kuru, Oktay, Umit Kemal Sentürk, Günnur Koçer, Sadi Ozdem, Oğuz K. Başkurt, Arzu Cetin, Akin Yeşilkaya, and Filiz Gündüz. 2009. "Effect of Exercise Training on Resistance Arteries in Rats with Chronic NOS Inhibition." Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 107 (3): 896–902. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91180.2008.

Lakens, Daniël. 2013. "Calculating and Reporting Effect Sizes to Facilitate Cumulative Science: A Practical Primer for t-Tests and ANOVAs." Frontiers in Psychology 4 (November). https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863.

Larsen, F. J., E. Weitzberg, J. O. Lundberg, and B. Ekblom. 2007. "Effects of Dietary Nitrate on Oxygen Cost during Exercise." Acta Physiologica (Oxford, England) 191 (1): 59–66. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01713.x.

Larsen, Filip J., Tomas A. Schiffer, Sara Borniquel, Kent Sahlin, Björn Ekblom, Jon O. Lundberg, and Eddie Weitzberg. 2011. "Dietary Inorganic Nitrate Improves Mitochondrial Efficiency in Humans." Cell Metabolism 13 (2): 149–59. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.004.

Laurent, Stéphane, Pierre Boutouyrie, and Patrick Lacolley. 2005. "Structural and Genetic Bases of Arterial Stiffness." Hypertension (Dallas, Tex.: 1979) 45 (6): 1050–55. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000164580.39991.3d.

Lavi, Shahar, Rania Egbarya, Ronit Lavi, and Giris Jacob. 2003. "Role of Nitric Oxide in the Regulation of Cerebral Blood Flow in Humans: Chemoregulation Versus Mechanoregulation." Circulation 107 (14): 1901–5. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000057973.99140.5A.

Le Plénier, Servane, Arthur Goron, Athanassia Sotiropoulos, Eliane Archambault, Chantal Guihenneuc, Stéphane Walrand, Jérome Salles, et al. 2017. "Citrulline Directly Modulates Muscle Protein Synthesis via the PI3K/MAPK/4E-BP1 Pathway in a Malnourished State: Evidence from in Vivo, Ex Vivo, and in Vitro Studies." American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism 312 (1): E27–36. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00203.2016.

Le Roux-Mallouf, Thibault, Florence Vibert, Stéphane Doutreleau, and Samuel Verges. 2017. "Effect of Acute Nitrate and Citrulline Supplementation on Muscle Microvascular Response to Ischemia-Reperfusion in Healthy Humans." Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme 42 (9): 901–8. https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0081.

Lévénez, Morgan, S. Jayne Garland, Malgorzata Klass, and Jacques Duchateau. 2008. "Cortical and Spinal Modulation of Antagonist Coactivation during a Submaximal Fatiguing Contraction in Humans." Journal of Neurophysiology 99 (2): 554–63. https://doi.org/10.1152/jn.00963.2007.

Lundberg, Jon O., Mattias Carlström, and Eddie Weitzberg. 2018. "Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease." Cell Metabolism 28 (1): 9–22. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.007.

Lundberg, Jon O., and Mirco Govoni. 2004. “Inorganic Nitrate Is a Possible Source for Systemic Generation of Nitric Oxide.” Free Radical Biology & Medicine 37 (3): 395–400. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027.

Lundberg, Jon O., Eddie Weitzberg, and Mark T. Gladwin. 2008. “The Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway in Physiology and Therapeutics.” Nature Reviews. Drug Discovery 7 (2): 156–67. https://doi.org/10.1038/nrd2466.

Mairbäurl, Heimo. 2013. “Red Blood Cells in Sports: Effects of Exercise and Training on Oxygen Supply by Red Blood Cells.” Frontiers in Physiology 4: 332. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00332.

Masschelein, Evi, Ruud Van Thienen, Xu Wang, Ann Van Schepdael, Martine Thomis, and Peter Hespel. 2012. “Dietary Nitrate Improves Muscle but Not Cerebral Oxygenation Status during Exercise in Hypoxia.” Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 113 (5): 736–45. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01253.2011.

McMahon, Nicholas F., Michael D. Leveritt, and Toby G. Pavey. 2017. “The Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Endurance Exercise Performance in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis.” Sports Medicine (Auckland, N.Z.) 47 (4): 735–56. https://doi.org/10.1007/s40279-016-0617-7.

Moinard, C., J. Maccario, S. Walrand, V. Lasserre, J. Marc, Y. Boirie, and L. Cynober. 2016. “Arginine Behaviour after Arginine or Citrulline Administration in Older Subjects.” The British Journal of Nutrition 115 (3): 399–404. https://doi.org/10.1017/S0007114515004638.

Muggeridge, David J., Nicholas Sculthorpe, Philip E. James, and Chris Easton. 2017. “The Effects of Dietary Nitrate Supplementation on the Adaptations to Sprint Interval Training in Previously Untrained Males.” Journal of Science and Medicine in Sport 20 (1): 92–97. https://doi.org/10.1016/j.jsams.2016.04.014.

Murrell, Carissa J., James D. Cotter, Kate N. Thomas, Samuel J. E. Lucas, Michael J. A. Williams, and Philip N. Ainslie. 2013. “Cerebral Blood Flow and Cerebrovascular Reactivity at Rest and during Sub-Maximal Exercise: Effect of Age and 12-Week Exercise Training.” Age 35 (3): 905–20. https://doi.org/10.1007/s11357-012-9414-x.

Niemeijer, Victor M., Jasper P. Jansen, Thomas van Dijk, Ruud F. Spee, Eduard J. Meijer, Hareld M. C. Kemps, and Pieter F. F. Wijn. 2017. “The Influence of Adipose Tissue on Spatially Resolved Near-Infrared Spectroscopy Derived Skeletal Muscle Oxygenation: The Extent of the Problem.” Physiological Measurement 38 (3): 539–54. https://doi.org/10.1088/1361-6579/aa5dd5.

Nisoli, Enzo, Emilio Clementi, Clara Paolucci, Valeria Cozzi, Cristina Tonello, Clara Sciorati, Renata Bracale, et al. 2003. “Mitochondrial Biogenesis in Mammals: The Role of Endogenous Nitric Oxide.” Science (New York, N.Y.) 299 (5608): 896–99. https://doi.org/10.1126/science.1079368.

Osowska, S., T. Duchemann, S. Walrand, A. Paillard, Y. Boirie, L. Cynober, and C. Moinard. 2006. “Citrulline Modulates Muscle Protein Metabolism in Old Malnourished Rats.” American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism 291 (3): E582-586. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00398.2005.

Paddon-Jones, Douglas, Elisabet Børsheim, and Robert R. Wolfe. 2004. “Potential Ergogenic Effects of Arginine and Creatine Supplementation.” The Journal of Nutrition 134 (10 Suppl): 2888S-2894S; discussion 2895S.

Peebles, Karen, Leo Celi, Ken McGrattan, Carissa Murrell, Kate Thomas, and Philip N. Ainslie. 2007. “Human Cerebrovascular and Ventilatory CO2 Reactivity to End-Tidal, Arterial and Internal Jugular Vein PCO2.” The Journal of Physiology 584 (Pt 1): 347–57. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.137075.

Pereira, Telmo, and João Maldonado. 2018. “Pulse Wave Analysis Reproducibility with the Complior Analyse Device: A Methodological Study.” Blood Pressure Monitoring 23 (3): 164–70. https://doi.org/10.1097/MBP.0000000000000316.

Porcelli, Simone, Lorenzo Pugliese, Enrico Rejc, Gaspare Pavei, Matteo Bonato, Michela Montorsi, Antonio La Torre, Letizia Rasica, and Mauro Marzorati. 2016. "Effects of a Short-Term High-Nitrate Diet on Exercise Performance." Nutrients 8 (9). https://doi.org/10.3390/nu8090534.

Porcelli, Simone, Matthew Ramaglia, Giuseppe Bellistri, Gaspare Pavei, Lorenzo Pugliese, Michela Montorsi, Letizia Rasica, and Mauro Marzorati. 2015. "Aerobic Fitness Affects the Exercise Performance Responses to Nitrate Supplementation." Medicine and Science in Sports and Exercise 47 (8): 1643–51. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000577.

Richalet, Jean-Paul, Philippe Larmignat, Eric Poitrine, Murielle Letournel, and Florence Canouï-Poitrine. 2012. "Physiological Risk Factors for Severe High-Altitude Illness." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 185 (2): 192–98. https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1396OC.

Roberts, Lee D., Tom Ashmore, Ben D. McNally, Steven A. Murfitt, Bernadette O. Fernandez, Martin Feelisch, Ross Lindsay, et al. 2017. "Inorganic Nitrate Mimics Exercise-Stimulated Muscular Fiber-Type Switching and Myokine and γ-Aminobutyric Acid Release." Diabetes 66 (3): 674–88. https://doi.org/10.2337/db16-0843.

Sardeli, Amanda V., Arthur F. Gáspari, and Mara P. Chacon-Mikahil. 2018. "Acute, Short-, and Long-Term Effects of Different Types of Exercise in Central Arterial Stiffness: A Systematic Review and Meta-Analysis." The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness 58 (6): 923–32. https://doi.org/10.23736/S0022-4707.17.07486-2.

Schwedhelm, Edzard, Renke Maas, Ralf Freese, Donald Jung, Zoltan Lukacs, Alen Jambrecina, William Spickler, Friedrich Schulze, and Rainer H. Böger. 2008. "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Oral L-Citrulline and L-Arginine: Impact on Nitric Oxide Metabolism." British Journal of Clinical Pharmacology 65 (1): 51–59. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x.

Shannon, Oliver M., Lauren Duckworth, Matthew J. Barlow, Kevin Deighton, Jamie Matu, Emily L. Williams, David Woods, et al. 2017. "Effects of Dietary Nitrate Supplementation on Physiological Responses, Cognitive Function, and Exercise Performance at Moderate and Very-High Simulated Altitude." Frontiers in Physiology 8: 401. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00401.

Siervo, Mario, Jose Lara, Ikponmwonsa Ogbonmwan, and John C. Mathers. 2013. "Inorganic Nitrate and Beetroot Juice Supplementation Reduces Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis." The Journal of Nutrition 143 (6): 818–26. https://doi.org/10.3945/jn.112.170233.

Smith, Lori W., John D. Smith, and David S. Criswell. 2002. "Involvement of Nitric Oxide Synthase in Skeletal Muscle Adaptation to Chronic Overload." Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 92 (5): 2005–11. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00950.2001.

Thompson, Christopher, Lee J. Wylie, Jamie R. Blackwell, Jonathan Fulford, Matthew I. Black, James Kelly, Sinead T. J. McDonagh, et al. 2017. "Influence of Dietary Nitrate Supplementation on Physiological and Muscle Metabolic Adaptations to Sprint Interval Training." Journal of Applied Physiology 122 (3): 642–52. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00909.2016.

Thompson, Christopher, Lee J. Wylie, Jonathan Fulford, James Kelly, Matthew I. Black, Sinead T. J. McDonagh, Asker E. Jeukendrup, Anni Vanhatalo, and Andrew M. Jones. 2015. "Dietary Nitrate Improves Sprint Performance and Cognitive Function during Prolonged Intermittent Exercise." European Journal of Applied Physiology 115 (9): 1825–34. https://doi.org/10.1007/s00421-015-3166-0.

Tinken, Toni M., Dick H. J. Thijssen, Mark A. Black, N. Timothy Cable, and Daniel J. Green. 2008. "Time Course of Change in Vasodilator Function and Capacity in Response to Exercise Training in Humans." The Journal of Physiology 586 (20): 5003–12. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.158014.

Van Bortel, Luc M., Stephane Laurent, Pierre Boutouyrie, Phil Chowienczyk, J. K. Cruickshank, Tine De Backer, Jan Filipovsky, et al. 2012. "Expert Consensus Document on the Measurement of Aortic

Stiffness in Daily Practice Using Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity." Journal of Hypertension 30 (3): 445–48. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32834fa8b0.

Waugh, W. H., C. W. Daeschner, B. A. Files, M. E. McConnell, and S. E. Strandjord. 2001. "Oral Citrulline as Arginine Precursor May Be Beneficial in Sickle Cell Disease: Early Phase Two Results." Journal of the National Medical Association 93 (10): 363–71.

Whitfield, J., A. Ludzki, G. J. F. Heigenhauser, J. M. G. Senden, L. B. Verdijk, L. J. C. van Loon, L. L. Spriet, and G. P. Holloway. 2016. "Beetroot Juice Supplementation Reduces Whole Body Oxygen Consumption but Does Not Improve Indices of Mitochondrial Efficiency in Human Skeletal Muscle." The Journal of Physiology 594 (2): 421–35. https://doi.org/10.1113/JP270844.

Wijnands, Karolina A. P., Hans Vink, Jacob J. Briedé, Ernst E. van Faassen, Wouter H. Lamers, Wim A. Buurman, and Martijn Poeze. 2012. "Citrulline a More Suitable Substrate than Arginine to Restore NO Production and the Microcirculation during Endotoxemia." PloS One 7 (5): e37439. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037439.

Wylie, Lee J., James Kelly, Stephen J. Bailey, Jamie R. Blackwell, Philip F. Skiba, Paul G. Winyard, Asker E. Jeukendrup, Anni Vanhatalo, and Andrew M. Jones. 2013. "Beetroot Juice and Exercise: Pharmacodynamic and Dose-Response Relationships." Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 115 (3): 325–36. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00372.2013.

Zago, Anderson Saranz, Joon-Young Park, Nicola Fenty-Stewart, Leonardo Reis Silveira, Eduardo Kokubun, and Michael D. Brown. 2010. "Effects of Aerobic Exercise on the Blood Pressure, Oxidative Stress and ENOS Gene Polymorphism in Pre-Hypertensive Older People." European Journal of Applied Physiology 110 (4): 825–32. https://doi.org/10.1007/s00421-010-1568-6.

Zajac, Adam, Stanisław Poprzecki, Aleksandra Zebrowska, Małgorzata Chalimoniuk, and Jozef Langfort. 2010. "Arginine and Ornithine Supplementation Increases Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-1 Serum Levels after Heavy-Resistance Exercise in Strength-Trained Athletes." Journal of Strength and Conditioning Research 24 (4): 1082–90. https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d321ff.

Partie III

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Après avoir présenté les différents travaux réalisés au cours de ce travail de thèse, nous allons maintenant discuter les interêts thérapeutiques et/ou ergogéniques des précurseurs de NO au cours d'une synthèse générale. Nous évoquerons aussi les perspectives de recherche qui émanent de ce travail.

Les objectifs des quatre études présentées étaient de comparer chez les sujets jeunes ou âgés en bonne santé, l'effet de différents précurseurs de NO en prise aigüe ou chronique, sur la fonction vasculaire, la performance à l'exercice et la réponse à l'entrainement.

Nous avons pu montrer que :

- ☺ Chez le sujet jeune, la supplémentation en nitrate et citrulline ou nitrate seul, améliore la réponse hyperémique post-occlusive,

- ☺ Chez le sujet jeune, la supplémentation aigüe en précurseurs de NO n'a eu aucun effet sur la performance à l'exercice et l'oxygénation cérébrale et musculaire ainsi que sur les cinétiques de fatigue neuromusculaire ; par contre la supplémentation chronique améliore les effets de l'entrainement sur la fonction musculaire,

- ☺ Chez le sujet âgé en bonne santé, la supplémentation chronique en nitrate et citrulline diminue la pression artérielle sans effet sur la rigidité artérielle, la réponse hyperémique post-occlusive et la vasoréactivité à l'hypoxie et l'hypercapnie au repos ou à l'exercice,

- ☺ Chez le sujet âgé, le groupe supplémenté en nitrate et citrulline améliore les performances maximales aérobies (PMA) et sous maximales (FC et VO_2 à intensité sous maximale plus faibles à isowatt).

Quel intérêt sur la fonction vasculaire ?

→ Réponse hyperémique post-occlusive

Comme décrit dans la partie méthodologie, la phase d'hyperémie a été caractérisée par les changements d'HbO_2 et d'HbTot mesurés par NIRS sur le vaste externe et le jumeau interne. Les cinétiques d'HbO_2 et d'HbTot montrent une augmentation de l'oxygénation microcirculatoire musculaire qui peut être la conséquence d'une augmentation du taux d'hématocrite local induit par l'augmentation du débit sanguin (Kindig, Richardson, and Poole 2002; Poole et al. 2013). En condition physiologique, quand l'occlusion est levée, la vasodilatation flux-dépendante entraine une augmentation du diamètre des artères de conduction par synthèse endothéliale de NO. L'amplitude de la vasodilatation est donc en partie dépendante de la biodisponibilité locale en NO (Roustit and Cracowski 2013; Crecelius et al. 2013).

Chez le sujet en bonne santé, nous avons pu rapporter que seule la prise aigüe de précurseurs de NO pouvait augmenter la réponse hyperémique post-occlusive. Dans notre expérience, l'effet des précurseurs de NO était essentiellement dû à la supplémentation de la voie NOS-indépendante, par facilitation de la réduction du nitrite en NO durant la phase d'ischémie.

Ces résultats, ainsi que ceux de la littérature, mettent en avant l'importance de la concentration plasmatique de nitrite au moment de la mesure. Dans la méta-analyse de Jackson et al. (2018), aucune relation n'est retrouvée entre durée de la supplémentation et effet sur la fonction vasculaire, mais par contre un effet positif est systématiquement présent dès que les mesures sont faites en moyenne 2h30 après la supplémentation (1h30 à 4h après la prise de 500 mg ou plus de nitrate).

Dans nos études, les mesures étaient effectuées au-delà de 6h après la dernière prise du complément (publication 3 et 4). Ce choix méthodologique nous permettait de se focaliser sur l'effet chronique de la supplémentation. Considérant les cinétiques plasmatiques de l'ion nitrite, il est possible que sa concentration soit trop faible pour augmenter la biodisponibilité en NO.

La qualité de la fonction endothéliale initiale semble également influencer l'effet de la prise de précurseurs de NO. L'augmentation de la réponse hyperémique est évidente lorsqu'il existe une altération de la fonction vasculaire que ce soit après une

supplémentation en nitrate (Jackson et al. 2018) ou en L-citrulline (Allerton et al. 2018). La méta-analyse de Bai et al. (2009) renforce cette idée en montrant une corrélation négative entre la réponse hyperémique initiale et celle mesurée après la prise aigüe de L-arginine. Tout ceci suggère que la supplémentation en L-citrulline pourrait améliorer la fonction endothéliale quand celle-ci est limitée par la quantité de L-arginine pour la NOS, ce qui n'est pas le cas chez le sujet sain.

La supplémentation en précurseurs de NO pourrait n'améliorer la fonction endothéliale lors d'un test d'ischémie-reperfusion que grâce à la voie NOS-indépendante. En effet, les conditions créées par l'occlusion lors de la phase d'ischémie locale pourraient à la fois diminuer en partie l'activité des NOS et faciliter la réduction du nitrite en NO. Ce mécanisme viendrait confirmer le caractère complémentaire des deux voies de synthèse de NO, et montrer l'intérêt de supplémenter la voie NOS-indépendante quand la voie NOS-dépendante est altérée.

→ Fonction vasculaire vasomotrice

La supplémentation en précurseurs de NO n'a eu aucun effet sur la PA et la rigidité artérielle mesurée par la VOP chez le sujet jeune en prise aigüe (publication 1 et 2) ou chronique (publication 4). Chez le sujet jeune en bonne santé et dans des conditions physiologiques, la fonction endothéliale de repos est normale et la biodisponibilité en NO au niveau systémique semble suffisante. Si la réduction du nitrite en NO est limitée au repos, elle s'opère par contre dans des conditions d'acidose métabolique, comme à l'exercice intense, ou d'hypoxie tissulaire.

Chez le sujet âgé en revanche, la supplémentation chronique induit une réduction de la PAS et de la PAM, sans diminuer la VOP carotido-fémorale. L'augmentation de la biodisponibilité en NO pourrait avoir un effet principalement sur les artères de conduction périphériques ayant une proportion importante de cellules musculaires lisses. Alors que ces dernières assurent la vasomotrocité notamment par l'intermédiaire du NO dans les artères de conduction et les artérioles, le ratio collagène/élastine assure l'élasticité dans les grosses artères comme l'aorte. Chez la personne âgée, il existe une hétérogénéité de la rigidité artérielle induite par l'altération de la structure des artères. Avec l'âge, la rigidité aortique augmente davantage que la rigidité artérielle périphérique (Mitchell et al. 2004; Benetos et al. 1993). Les précurseurs du NO pourraient donc avoir

un effet sur la PA périphérique par diminution du tonus vasculaire, sans diminuer la rigidité aortique.

En considérant que l'effet aigu ait pu être limité par le délai entre les mesures et la dernière prise de précurseurs de NO, la diminution de pression artérielle pourrait être expliquée par une amélioration à long terme de la biodisponibilité en NO. Chez l'animal une hypertrophie myocardique ventriculaire gauche, Ahmad et al. (2016) ont rapporté que la supplémentation en L-arginine améliorait la synthèse de NO par les eNOS cardiaques en augmentant l'activité des eNOS et de leur expression génique. Bien qu'aucune étude ne l'ait montré chez l'homme, il semblerait que l'augmentation de la biodisponibilité en L-arginine puisse améliorer la synthèse basale de NO en restaurant la voie NOS-dépendante.

→ Réponses à l'hypercapnie et l'hypoxie

Les réponses cardiorespiratoires et cérébrovasculaires à l'hypercapnie et à l'hypoxie n'ont pas été modifiées par la supplémentation chronique en précurseurs de NO. Au niveau cérébral, l'implication du NO dans le couplage neurovasculaire est significative, en particulier par la synthèse de NO par les nNOS des neurones en activité (Dormanns, Brown, and David 2016). L'autorégulation vasculaire cérébrale semble par contre plus dépendante d'autres facteurs comme l'adénosine ou les prostaglandines (Wylie, Bailey, et al. 2016). Ceci est appuyé par l'absence d'effet de L-NMMA sur la réponse cérébrale à l'hypercapnie et l'hypoxie indiquant que le NO n'est pas nécessaire dans la vasodilatation (Ide et al. 2007).

→ Intérêt thérapeutique et modalités de supplémentation

L'importance de la concentration plasmatique en nitrite et L-arginine dans l'amélioration de la fonction vasculaire, montre l'intérêt de répartir la prise en plusieurs fois pendant la journée. La prise toutes les 3 à 5h permettrait de maintenir des taux plasmatiques de nitrite et de L-arginine élevés pour maintenir une biodisponibilité en NO plus importante. L'apport de nitrate pourrait dans ce cas là être assuré par une consommation de fruits et légumes riches en nitrate consommés à chaque repas. L'apport de L-arginine et de L-citrulline pourrait également être en partie assuré par l'alimentation en fonction de l'équilibre alimentaire. L'augmentation de la quantité et de l'activité des NOS par la L-arginine représente également une piste intéressante dans la prise en charge de la dysfonction endothéliale sur le long terme.

Quel intérêt sur la fonction vasculaire à l'effort ?

Aucune modification des signaux NIRS à l'exercice après les prises aigües ou chroniques de précurseurs de NO n'a pu être rapportée, que ce soit chez le sujet jeune ou le sujet âgé en bonne santé (publication n° 1, 2 et 3).

De nombreuses revues d'articles se sont focalisées sur l'intérêt de la mesure par NIRS de l'oxygénation musculaire et cérébrale à l'exercice (la plus récente : Grassi and Quaresima 2016). Bien que critiquée du fait de nombreuses limitations dans l'exploration fonctionnelle en physiologie de l'exercice, l'utilisation de la NIRS reste pertinente dans l'évaluation de l'utilisation de l'O_2 au niveau tissulaire. L'analyse des cinétiques d'HbO_2, HHB et HbTot permet de caractériser l'équilibre dynamique entre l'apport et la consommation d'O_2 locale au niveau de la zone d'intérêt.

Au regard de la littérature sur les rôles physiologiques du NO, nous avions émis l'hypothèse que la supplémentation aurait pu modifier les signaux NIRS par deux phénomènes.

Le premier est lié à l'effet du NO sur la vasomotricité. L'augmentation de la biodisponibilité en NO au niveau systémique pourrait diminuer le tonus vasculaire, et ainsi augmenter le débit sanguin et l'apport d'oxygène et de substrat énergétique à l'exercice dans les muscles actifs. Ceci entrainerait une modification de l'équilibre entre l'apport et la consommation d'oxygène induisant une augmentation des cinétiques d'HbO_2 et d'HbTot.

Le deuxième est lié à l'implication du NO dans la modification des rapports ATP-O_2 et ATP-force développée. La modification de ces derniers, pourrait induire une diminution de l'extraction d'O_2 à intensité sous-maximale. Ceci est susceptible de modifier le rapport HbO_2/HHb ou l'index d'oxygénation tissulaire (TSI) pendant l'effort.

Chez le sujet jeune, l'absence de différences dans les cinétiques de NIRS cérébrale et musculaire à l'exercice est cohérente avec l'absence de modification de la fonction vasculaire et de la VO_2 sous-maximale à l'effort. C'est plus étonnant chez le sujet âgé chez qui on observe des modifications hémodynamiques et cardiorespiratoires à l'effort sous-maximal alors que les signaux NIRS sont là aussi superposables avec ou sans supplémentation.

Peu d'études ont évalué l'effet de la biodisponibilité en NO sur la fonction vasculaire à l'effort chez l'homme (Craig et al. 2018; Bentley et al. 2017; Casey et al. 2015; J.-K. Kim et al. 2014). Ces études ont toutes rapporté une absence d'effet sur le débit sanguin musculaire mesuré dans les artères de conduction pendant l'exercice. De façon intéressante, Craig et al. (2018) ont rapporté une augmentation d'HHB sans modification d'HbTot comparé aux valeurs de repos après une supplémentation aigüe en nitrate pendant un effort local (exercice handgrip) de haute intensité, suggérant une extraction d'O_2 plus importante. D'après les auteurs, ceci pourrait être dû à l'amélioration de la perfusion microcirculatoire. La vasodilatation permettrait de perfuser des régions qui sont habituellement hypoperfusées, et d'augmenter ainsi la consommation absolue d'O_2 dans le muscle actif. Cette adaptation aigüe ne s'est cependant pas traduite par une amélioration de la performance.

Dans nos travaux, les signaux NIRS de chaque phase d'exercice sont présentés sous forme de delta, rapportés systématiquement aux valeurs de base. Ces valeurs de base ont été calculées sur une période d'exercice intiale, soit pendant un exercice de pédalage à intensité constante après 20 minutes de pédalage en hypoxie et normoxie, soit dès le début de l'exercice d'extension du quadriceps après échauffement au préalable. Les signaux de NIRS illustrent donc les modifications relatives d'oxygénation pendant l'exercice, sans caractériser les adaptations vasculaires et métaboliques absolues pendant la transition repos-exercice. De fait, il est possible que le rôle potentiel du NO dans les adaptations vasculaires et métaboliques durant la phase de mise en activité n'ait pu être détecté.

Les modifications vasculaires à l'exercice induites par l'augmentation de la biodisponibilité en NO doivent donc encore être explorées. L'effet sur le débit sanguin dans les artères de conduction semble faible chez le sujet en bonne santé, et n'apparait donc pas comme un mécanisme potentiel de l'augmentation de la performance. En revanche, les effets relativement robustes de l'augmentation de la biodisponibilité en NO sur la VO_2 (mesurée par échanges gazeux) montrent l'intérêt d'explorer l'équilibre entre l'apport et l'extraction en O_2 au niveau musculaire et cérébral.

Y a-t-il un intérêt ergogénique ?

La performance à l'exercice pourrait être améliorée par l'augmentation de la biodisponibilité en NO à travers plusieurs mécanismes. Dans nos quatre études, nous

avons pu évaluer l'effet des précurseurs de NO sur deux types d'effort incrémentaux allant jusqu'à épuisement des participants : un effort unilatéral d'extension isométrique du quadriceps et un effort maximal sur ergocycle. Chez le sujet jeune, les précurseurs de NO consommés de façon aigüe n'induisent pas d'amélioration significative de la performance maximale lors du test d'extension du quadriceps ***(publication n°2)***. Bien que non significatif, la majorité des sujets (12 sur 15) montre une augmentation du nombre de contractions lors d'une supplémentation en nitrate et citrulline par rapport au placebo ***(publication n°2)***. L'analyse inter-individuelle des effets met en évidence des différences de sensibilité, avec des profils répondeurs et des profils non répondeurs, pouvant expliquer la non-significativité des résultats. L'effet de la supplémentation devient significatif après la suppression d'un participant ($n = 14$; $p < 0,001$; Annexe 4). Dans ce cas là, le nombre de contractions est amélioré de 9,2 % après la prise de nitrate et de citrulline comparé à la prise d'un placebo. Aucune corrélation n'a pu être établie entre la sensibilité à la supplémentation et la fonction vasculaire initiale ou le niveau d'entrainement des sujets.

Chez la personne âgée, 4 semaines de supplémentation quotidienne en nitrate et citrulline induit une amélioration de la performance maximale (PMA), et une diminution du VO_2 et de la fréquence cardiaque sous-maximale mais aucune amélioration de la performance d'un muscle isolé. Ceci suggère que la supplémentation chronique en précurseurs de NO améliore davantage la performance sur un effort sollicitant le système cardiovasculaire (par un effet hémodynamique), que sur un effort local dépendant de la fonction musculaire. La diminution de la pression artérielle observée dans cette population conforte cette hypothèse. Ces résultats suggèrent une amélioration chronique de la synthèse endogène de NO, qui pourrait être possiblement limitée chez cette population.

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). Chez la personne agée, quatre études ont mis en evidence un effet positif de la supplementation en nitrate (chronique et aiguë) sur l'endurance (temps d'épuisement) (Berry et al. 2015; Eggebeen et al. 2016; Kenjale et al. 2011) et sur les cinétiques de VO_2 (Kelly et al. 2013) sur un effort sous-maximal. Cet effet pourrait être expliqué par une modification NO dépendante de l'efficience musculaire, à travers deux mécanismes (Jones et al. 2018) :

- Diminution du coût en O_2 de la resynthèse de l'ATP (Larsen et al. 2011a),
- Diminution du coût en ATP de la contraction musculaire (Bailey et al. 2010).

L'amélioration du rapport ATP/O_2 est dépendant du couplage de la respiration mitochondriale. Le NO réduit la fuite des protons au niveau de la chaine respiratoire et limite donc le découplage mitochondriale et l'altération des phosphorylations oxydatives induit par l'exercice. Cette réduction des fuites induit une augmentation de la production d'ATP par molécule d'O_2 consommée (Larsen et al. 2011).

L'amélioration du rapport ATP/force développée pourrait être liée au métabolisme du calcium, en augmentant sa libération (Jones et al. 2018). La diminution de consommation d'ATP limite son hydrolyse, ce qui diminue les perturbations métaboliques, accumulation de Pi et d'ADP et déplétion de PCr. Cette limitation des perturbations pourrait retarder l'apparition de la fatigue et expliquer l'augmentation de la résistance à l'effort lors d'exercices à intensité constante ou progressive (Allen, Lamb, and Westerblad, 2008).

A travers ce travail, et au regard de la littérature, il apparait que l'effet ergogénique des précurseurs de NO n'est pas systématique. Là encore, l'effet sur la fonction musculaire n'est présent que quand l'effort est réalisé tôt après l'ingestion (1h30 en moyenne) ce qui souligne l'importance de la concentration plasmatique en nitrate et L-arginine (L-citrulline) pendant l'effort.

L'effet d'une prise chronique de précurseurs de NO chez la personne âgée indique une adaptation de la synthèse basale endogène de NO permettant d'améliorer la performance à l'effort. Puisque la fonction vasculaire s'altère avec l'âge, la supplémentation chronique en précurseurs de NO peut améliorer la performance à l'effort quand la synthèse de NO est limitante.

Finalement, l'effet ergogénique des précurseurs de NO semble dépendre de l'amplitude de la modification de la biodisponibilité en NO. Autrement dit, comme illustré dans la figure 24, l'effet est présent lorsque la biodisponibilité en NO initiale est faible, et que le stress physiologique (désoxygénation, baisse du pH), induit par l'exercice, augmente la synthèse de NO par la voie NOS-indépendante. A l'inverse, l'effet serait faible chez l'athlète lors d'un exercice à dominante aérobie (faible réduction de l'ion nitrite) du fait notamment d'une synthèse optimale de NO par la voie NOS-dépendante (figure 24).

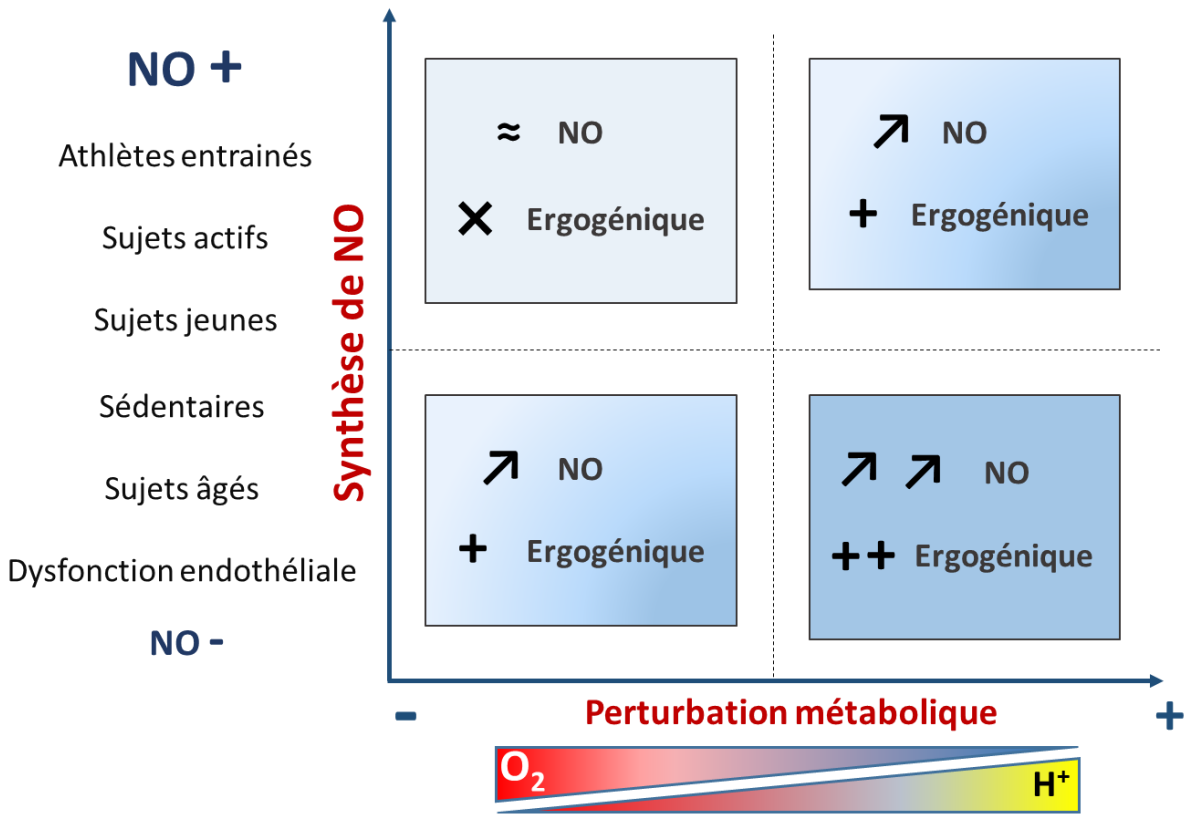


Figure 24. Effet ergogénique des précurseurs de NO en fonction de la fonction endothéliale et du type d'exercice

→ Effet des précurseurs de NO sur les réponses à l'entrainement

A travers le programme d'entrainement décrit dans la ***publication n°4***, nous avons pu rapporter que la prise quotidienne de précurseurs de NO ne permettait pas aux participants d'augmenter la charge d'entrainement pendant les séances, que ce soit sur un effort de haute intensité sur ergocycle (session 1), ou sur un exercice de renforcement musculaire (session 2). Les sessions d'entrainement étaient effectuées au sein du laboratoire en fin de journée, au moins 7h après la prise des précurseurs de NO, ce qui limitait les effets aigus. Bien que la charge de travail soit identique, le groupe supplémenté quotidiennement par du nitrate et de la citrulline avait progressé davantage sur la force maximale ainsi que le nombre de contractions réalisé avant épuisement. Il est possible que le développement de la force maximale ait été amélioré par des modifications structurales résultantes de plusieurs mécanismes potentiels :

- Activation plus importante des voies de signalisation de la synthèse protéique (nitrate (Roberts et al. 2017) et L-citrulline(Le Plénier et al. 2017)),

- Diminution de la proportion de fibres IIb (nitrate (Thompson et al. 2016; Roberts et al. 2017)),
- Augmentation du pool plasmatique d'acides aminés disponibles pour la resynthèse musculaire (L-citrulline (Breuillard et al. 2015)),
- Amélioration de la vascularisation et de la récupération après l'effort (nitrate et/ou L-citrulline),
- Amélioration de l'apport d'acides aminés au niveau microcirculatoire dans les tissus musculaires endommagés par l'entrainement (nitrate et/ou L-citrulline).

Conclusion

Il est possible d'augmenter la biodisponibilité de NO au niveau systémique chez l'homme par différentes interventions nutritionnelles. Alors que l'apport de L-citrulline augmente la synthèse de NO par les NOS, l'apport de nitrate assure un réservoir momentané de nitrite et de NO quand la voie NOS-dépendante est altérée (hypoxémie, exercice intense, ischémie-reperfusion, pathologies) et que la demande en NO est importante. Bien qu'intéressant pour la fonction vasculaire, l'augmentation de la biodisponibilité en NO apparait comme initiateur ou acteur d'autres adaptations physiologiques. Cette diversité de mécanismes susceptibles d'être améliorés par la biodisponibilité en NO, font des précurseurs de NO des compléments alimentaires ergogéniques et thérapeutiques intéressants. Cependant, leur consommation doit être contrôlée et adaptée en termes de doses, de durée et de forme d'ingestion, mais aussi en fonction de la population concernée (sportif ou patient) et de l'objectif recherché.

Pour aller plus loin

Complémentarité et rétrocontrôle des voies de synthèse de NO

L'homéostasie de la biodisponibilité en NO est dépendante de l'équilibre entre la synthèse de NO par la voie NOS-dépendante et la voie NOS-indépendante. Alors que la supplémentation des deux voies est au cœur des débats, l'inter-relation et le rétrocontrôle de l'une envers l'autre restent inexplorés chez l'homme. Nous avons vu précédemment que la NOS était activée par différents mécanismes, mais elle peut également être désactivée ou inhibée. Plusieurs facteurs inhibiteurs ont été mis en évidence et notamment le NO lui-même, qui induit un rétrocontrôle négatif de l'activité de la NOS. L'équipe de Lang et al. (2007) a évalué l'effet du NO inhalé sur les lésions d'ischémie-

reperfusion sur une transplantation hépatique. De façon inattendue, l'inhalation de NO réduisait de 80% l'expression des NOS pendant la phase de reperfusion. Ceci a été confirmé plus récemment par les travaux effectués chez l'animal par Carlström et al. (2015) qui ont évalué l'effet de la prise chronique de nitrate sur l'expression des NOS. La consommation quotidienne de nitrate de sodium pendant deux semaines diminuait de façon réversible l'activité des NOS et donc la synthèse de NO par la voie NOS-dépendante. L'utilisation de nitrate à long terme, notamment dans un but thérapeutique, pourrait donc avoir des effets négatifs similaires à ceux observés après utilisation de nitrate organique (cf chapitre « Différence entre nitrate organique et nitrate inorganique »). De ce fait, il semble intéressant de réserver l'utilisation du nitrate dans des conditions où l'activité des NOS est susceptible d'être diminuée chez le sujet sain ou chez le sujet malade (hypoxémie aigüe ou chronique, malnutrition) et de l'utiliser de façon spontanée chez le sportif avant un effort intense. Cependant, les doses ingérées par les souris dans l'étude de Carlström et al. (2015) correspondent à une dose qui n'a jamais été étudiée chez l'homme, car trop importante. L'effet négatif du nitrate sur le long terme reste donc une hypothèse qui doit être testée en utilisant des doses correspondantes à celles utilisées classiquement chez l'homme.

Différence entre nitrate organique et nitrate inorganique

Dans le milieu médical, le mot "nitrate" est utilisé pour parler des nitrates «organiques», comme le trinitrate de glycérol considéré comme un dérivé nitré. Le nitrate issu de l'alimentation est lui, considéré comme un nitrate inorganique. Bien que ces deux formes de nitrate voient leurs effets cardiovasculaires s'exercer par l'intermédiaire de la libération de NO, ils se distinguent par d'importantes différences qui ont été identifiées par (Sami A. Omar, Artime, and Webb 2012) dans une revue de littérature.

De structure complexe, les nitrates et nitrites organiques sont, à l'exception du nitrite d'éthyle, des produits de synthèse créés et utilisés par l'industrie pharmaceutique. A l'inverse, de structure ionique et naturelle, les nitrates et nitrites inorganiques sont l'objet à la fois d'une synthèse endogène et d'un apport exogène par l'alimentation.

Les nitrates inorganiques empruntent les voies digestives, et la circulation entérosalivaire permettant ainsi d'induire des variations faibles et progressives des taux plasmatiques en nitrite. Ceci permet d'induire un effet anticipé et durable sur la vasodilatation. A l'inverse, n'étant pas soumis à une circulation entérosalivaire, les nitrates organiques peuvent être

à l'origine de vasodilatations aigües par des cinétiques plasmatiques spontanées. Ceci entraine des variations brusques et une grande amplitude du taux plasmatique de nitrite. L'utilisation chronique des nitrates organiques est limitée par l'apparition d'effets secondaires (dysfonction endothéliale) et d'accoutumance. Le phénomène d'accoutumance aux nitrates organiques donne lieu à une diminution des effets pharmacologiques sur la vasodilatation et la pression artérielle de façon chronique. A l'inverse, les nitrates et les nitrites inorganiques ne voient pas leurs effets diminuer dans le temps.

Bien que les nitrates organiques continuent à être majoritaires dans la prise en charge des pathologies cardiovasculaires, le nombre d'études croissant montrant l'intérêt des nitrates inorganiques pourraient amener ces derniers à jouer un rôle de choix dans la prise en charge thérapeutique.

D'où vient le nitrate ?

Mon implication dans le développement du produit enrichi en nitrate m'a amené vers d'autres questionnements, et notamment celui sur la qualité de l'ion nitrate ingéré. Le titrage de l'ion nitrate dans les compléments alimentaires a été effectué plusieurs fois dans un laboratoire indépendant par chromatographie en phase liquide à haute performance. Les concentrations mesurées pouvaient varier du simple au quadruple en fonction des différents lots de betterave et de salade utilisés par le fabricant de matière première. Pour essayer de comprendre cette différence, j'ai été aidé par Eric Brunet ingénieur agronome (Meynes), ainsi que Christiant Perrier Enseignant-chercheur à Vetagro-sup (Clermont-Ferrand).

La teneur en nitrate des légumes consommés dépend de la disponibilité en azote dans le milieu de culture. Tout d'abord l'azote sous sa forme minérale ne peut pas être stocké dans le sol comme les autres éléments minéraux nécessaires à la construction cellulaire des végétaux. Il faut obligatoirement un apport régulier pour assurer le métabolisme de base de la plante.

L'azote provient de deux sources différentes (rapport BRGM 2017, projet ISOCAIX) :

- Dans un écosystème naturel, ce sont les débris végétaux et excréments d'animaux qui fournissent la matière organique qui va se dégrader en humus puis fournir les matières minérales azotées,
- Dans une exploitation agricole, l'azote est apporté en grande quantité par les espèces nitratées (dérivés azotés) produites par synthèse industrielle et répandues en tant qu'engrais fertilisant.

Dans les deux cas, l'azote va se transformer sous l'action des bactéries en nitrates ou nitrites. Le nitrate présent dans les légumes peut donc provenir du métabolisme normal de la plante ou de l'épandage d'engrais fertilisant.

L'ion nitrate est toujours exprimé selon sa structure NO_3^- qui est utilisé comme tel sans différencier la structure de la matière (positionnement des charges électroniques, polarité, projection). La question est de savoir si ce nitrate présent dans les légumes est de la même qualité en fonction de la source d'azote considérée. Bien que cette question ne soit pas encore traitée, il serait possible de caractériser la provenance du nitrate présent dans les compléments alimentaires et ainsi limiter l'ingestion de nitrate issue des dérivés nitrés.

A ma connaissance, cette question n'a pas été soulevée dans le domaine des compléments alimentaires. En revanche, l'analyse de la pollution des nappes phréatiques par l'ion nitrate a permis la mise au point de techniques de différenciation de la provenance de celui-ci. L'objectif était d'identifier les sources majeures pour limiter la pollution des nappes et garantir la qualité des eaux potables. L'utilisation du traçage isotopique permet de différencier le nitrate issu des engrais répandus, ou issue de l'oxydation des produits de l'activité humaine, du nitrate issu de l'azote apporté naturellement à la plante (rapport BRGM/RP-54028-FR : Etude isotopique de l'origine des nitrates). Une technique similaire pourrait être utilisée pour identifier la source du nitrate présent dans les compléments alimentaires et les différents aliments consommés.

Ces dernières années, la multiplication des recherches sur l'intérêt de l'ion nitrate chez l'homme a popularisé son utilisation dans la population générale, que ce soit dans le monde de la santé ou dans le monde de la performance. Cependant l'existence de différentes formes de nitrate et nitrite ainsi que leurs effets physiologique respectifs chez l'homme pourraient expliquer en partie les disparités de la littérature scientifique dans le domaine et ouvrent de nouvelles pistes de recherche.

Développement du complément alimentaire

L'objectif industriel de la collaboration CIFRE était de développer un complément alimentaire augmentant la biodisponibilité en NO et répondant aux exigences du marché actuel. Ce complément alimentaire devait être vendu dans la catégorie des PRE-WORKOUT, à consommer donc avant l'effort pour améliorer la congestion musculaire et la performance à l'effort.

Le projet de développement était défini comme suit :

- Un produit enrichi en nitrate d'origine naturel (extrait végétal) et L-citrulline pure,
- Dose cible de nitrate : 520 mg de nitrate
- Dose cible de L-citrulline : 6 g
- Une faible quantité totale à ingérer, consommation rapide avant l'entrainement (60 à 100ml),
- Sous forme de poudre à diluer ou sous forme de liquide prêt à boire,
- Un goût sucré et fruité, et une texture homogène,
- Un coût de revient et une marge répondant aux exigences de Netquattro.

1ère version *(publication 1)*: Extrait sec de betterave (0.65%)

Les débuts du projet de développement nous ont amenés à travailler sur un extrait sec de betterave riche en nitrate. L'extrait sec de betterave était disponible en produit standard chez plusieurs fournisseurs de matière première, concentré en nitrate à hauteur de 0.65 % (6500 ppm).

Pour les premières expérimentations ***(Publication 1)***, le complément alimentaire était conditionné en sachet individuel sous forme de poudre à diluer dans 250-350 ml d'eau, et apportait 1200 mg de nitrate et 6 g de citrulline. La quantité d'eau importante permettait une dilution adéquate et un adoucissement du goût.

Cependant cette première version ne répondait pas à deux des exigences du projet de développement initial :

- La quantité à ingérer était trop importante, ce qui entrainait des dérangements gastriques chez certains participants,
- Le goût de betterave concentré était trop important, une partie des participants a eu du mal à ingérer la totalité du complément.

2ème version *(Publication 2)*: Extrait sec de betterave (0.65%)

Pour des raisons scientifiques, la dose de nitrate ingérée pour la deuxième partie des expérimentations a été diminuée de 1200 à 520 mg. Ceci nous a permis de diminuer la dose de poudre et la quantité d'eau, diminuant ainsi la quantité totale à ingérer.
Cette deuxième version ne corrigeait cependant pas les problèmes relevés sur la première:

- La quantité à ingérer était toujours trop importante, mais n'entrainait plus de dérangement gastrique,
- Le goût de betterave concentré était encore trop important et une partie des 15 participants éprouvaient des difficultés à ingérer la totalité.

Cette deuxième phase d'expérimentation a duré 6 mois. Malgré la conservation à température ambiante et à faible taux d'humidité, nous avons pu constater une instabilité de l'extrait sec de betterave (agrégation). Ceci devait être corrigé dans le cadre d'une supplémentation chronique afin de conserver les qualités nutritionnelles de l'extrait.

3ème version *(Publication 3 et 4)*: Extrait sec de salade (4.0 %)

Après 8 mois de démarchage auprès de spécialistes de l'extraction végétale (19 laboratoires différents), nous avons pu aboutir sur un projet de développement d'un extrait sec de salade titré à 4% de nitrate. Cette concentration plus importante avait deux intérêts :

- Diminuer la dose d'extrait sec dans le produit fini et ainsi se rapprocher de la quantité cible initiale (60 à 100ml),
- La possibilité d'ajouter des additifs texturants et aromatiques pour améliorer le produit fini.

Après 4 ***(publication 3)*** et 8 semaines ***(publication 4)***, les participants n'ont déclaré aucun dérangement gastrique ni d'effets secondaires après la consommation du complément alimentaire. Le goût et l'homogénéité du produit fini était malgré tout encore à améliorer.

4ème Version : Produit commercialisable

Le développement du produit commercialisable est en cours et devrait pouvoir être présenté lors de la soutenance orale. Ceci serait l'aboutissement de la collaboration CIFRE et permettrait à Fitnessboutique de mettre en avant l'innovation et la recherche dans le développement de leur produit de nutrition sportive.

→ Etapes d'ores et déjà effectuées :

- ☺ Choix de l'extrait sec de salade (liquide, concentration en nitrate >7%),
- ☺ Choix de la L-citrulline (L-citrulline pure en poudre),
- ☺ Choix des arômes, et des conservateurs,
- ☺ Sourcing des articles de conditionnement : bouteille « shot » de 60 ml,
- ☺ Soumission et acceptation du projet auprès du façonnier collaborateur,
- ☺ Evaluation du taux de défilement (capacité de ventes annuelles par la société Netquattro Fitnessboutique),
- ☺ Choix du prix de vente maximum accepté,
- ☺ Evaluation du coût de revient (hors extrait sec végétal)

→ Etapes manquantes pour la finalisation :

- ☺ Validation économique du projet (prix de l'extrait sec de salade),
- ☺ Validation du rétroplanning de production,
- ☺ Projet infographique (visuel du shot et de l'emballage, communication magasin et site internet),
- ☺ Création d'outils de communications scientifiques vulgarisés pour la clientèle cible.

Ce dernier point est tout l'enjeu d'une collaboration CIFRE. L'objectif par la suite sera de communiquer sur le travail qui a été effectué afin de montrer l'implication de Netquattro dans la recherche et l'importance qu'ils donnent à la qualité de leur produit de nutrition. Cette communication passe par un équilibre entre vulgarisation et expertise, ce qui rassurera le client tout en augmentant la notoriété de Netquattro.

BIBLIOGRAPHIE

"(21) Nitrate-Rich Beetroot Juice Modulates Cerebral Blood Flow and Cognitive Performance in Humans | Request PDF." n.d. ResearchGate. Accessed October 11, 2018. https://www.researchgate.net/publication/251530166_Nitrate-rich_beetroot_juice_modulates_cerebral_blood_flow_and_cognitive_performance_in_humans.

Aamand, Rasmus, Thomas Dalsgaard, Yi-Ching Lynn Ho, Arne Møller, Andreas Roepstorff, and Torben E. Lund. 2013. "A NO Way to BOLD? Dietary Nitrate Alters the Hemodynamic Response to Visual Stimulation." *NeuroImage* 83 (December): 397–407. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.06.069.

Adachi, H., P. H. Nguyen, R. Belardinelli, D. Hunter, T. Jung, and K. Wasserman. 1997. "Nitric Oxide Production during Exercise in Chronic Heart Failure." *American Heart Journal* 134 (2 Pt 1): 196–202.

Ainslie, Philip N., Carissa Murrell, Karen Peebles, Marianne Swart, Margot A. Skinner, Michael J. A. Williams, and Robin D. Taylor. 2007. "Early Morning Impairment in Cerebral Autoregulation and Cerebrovascular CO2 Reactivity in Healthy Humans: Relation to Endothelial Function." *Experimental Physiology* 92 (4): 769–77. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.036814.

Allen, D. G., G. D. Lamb, and H. Westerblad. 2008. "Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms." *Physiological Reviews* 88 (1): 287–332. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007.

Allen, G. M., S. C. Gandevia, and D. K. McKenzie. 1995. "Reliability of Measurements of Muscle Strength and Voluntary Activation Using Twitch Interpolation." *Muscle & Nerve* 18 (6): 593–600. https://doi.org/10.1002/mus.880180605.

Allerton, Timothy D., David N. Proctor, Jacqueline M. Stephens, Tammy R. Dugas, Guillaume Spielmann, and Brian A. Irving. 2018. "L-Citrulline Supplementation: Impact on Cardiometabolic Health." *Nutrients* 10 (7). https://doi.org/10.3390/nu10070921.

Alvares, Thiago Silveira, Carlos Adam Conte, Vânia Margaret Flosi Paschoalin, Joab Trajano Silva, Cláudia de Mello Meirelles, Yagesh N. Bhambhani, and Paulo Sergio Chagas Gomes. 2012. "Acute L-Arginine Supplementation Increases Muscle Blood Volume but Not Strength Performance." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 37 (1): 115–26. https://doi.org/10.1139/h11-144.

Alvares, Thiago Silveira, Carlos Adam Conte-Junior, Joab Trajano Silva, and Vânia Margaret Flosi Paschoalin. 2012. "Acute L-Arginine Supplementation Does Not Increase Nitric Oxide Production in Healthy Subjects." *Nutrition & Metabolism* 9 (1): 54. https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-54.

Amra, Babak, Elaheh Karbasi, Mohammad Hashemi, Birgit Hoffmann-Castendiek, and Mohammad Golshan. 2009. "Endothelial Dysfunction in Patients with Obstructive Sleep Apnoea Independent of Metabolic Syndrome." *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 38 (5): 461–64.

Ashworth, Ann, and Raul Bescos. 2017. "Dietary Nitrate and Blood Pressure: Evolution of a New Nutrient?" *Nutrition Research Reviews*, May, 1–12. https://doi.org/10.1017/S0954422417000063.

"Atherosclerosis." 2008. *Panaceia or Hygeia* (blog). July 1, 2008. https://medicalmyths.wordpress.com/atherosclerosis/.

Atochin, Dmitriy N., and Paul L. Huang. 2010. "Endothelial Nitric Oxide Synthase Transgenic Models of Endothelial Dysfunction." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 460 (6): 965–74. https://doi.org/10.1007/s00424-010-0867-4.

Attwell, David, Alastair M. Buchan, Serge Charpak, Martin Lauritzen, Brian A. MacVicar, and Eric A. Newman. 2010. "Glial and Neuronal Control of Brain Blood Flow." *Nature* 468 (7321): 232–43. https://doi.org/10.1038/nature09613.

Aucouturier, Julien, Julien Boissière, Mehdi Pawlak-Chaouch, Grégory Cuvelier, and François-Xavier Gamelin. 2015. "Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Tolerance to Supramaximal Intensity Intermittent Exercise." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 49 (September): 16–25. https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.05.004.

Bahra, M., V. Kapil, V. Pearl, S. Ghosh, and A. Ahluwalia. 2012. "Inorganic Nitrate Ingestion Improves Vascular Compliance but Does Not Alter Flow-Mediated Dilatation in Healthy Volunteers." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 26 (4): 197–202. https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.01.004.

Bailey, Stephen J., Jamie R. Blackwell, Terrence Lord, Anni Vanhatalo, Paul G. Winyard, and Andrew M. Jones. 2015. "L-Citrulline Supplementation Improves O2 Uptake Kinetics and High-Intensity Exercise Performance in Humans." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 119 (4): 385–95. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00192.2014.

Bailey, Stephen J., Jamie R. Blackwell, Ewan Williams, Anni Vanhatalo, Lee J. Wylie, Paul G. Winyard, and Andrew M. Jones. 2016. "Two Weeks of Watermelon Juice Supplementation Improves Nitric Oxide Bioavailability but Not Endurance Exercise Performance in Humans." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 59: 10–20. https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.06.008.

Bailey, Stephen J., Jonathan Fulford, Anni Vanhatalo, Paul G. Winyard, Jamie R. Blackwell, Fred J. DiMenna, Daryl P. Wilkerson, Nigel Benjamin, and Andrew M. Jones. 2010. "Dietary Nitrate Supplementation Enhances Muscle Contractile Efficiency during Knee-Extensor Exercise in Humans." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 109 (1): 135–48. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00046.2010.

Bailey, Stephen J., Paul G. Winyard, Anni Vanhatalo, Jamie R. Blackwell, Fred J. DiMenna, Daryl P. Wilkerson, and Andrew M. Jones. 2010. "Acute L-Arginine Supplementation Reduces the O2 Cost of Moderate-Intensity Exercise and Enhances High-Intensity Exercise Tolerance." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 109 (5): 1394–1403. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00503.2010.

Bailey, Stephen J., Paul Winyard, Anni Vanhatalo, Jamie R. Blackwell, Fred J. Dimenna, Daryl P. Wilkerson, Joanna Tarr, Nigel Benjamin, and Andrew M. Jones. 2009. "Dietary Nitrate Supplementation Reduces the O2 Cost of Low-Intensity Exercise and Enhances Tolerance to High-Intensity Exercise in Humans." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 107 (4): 1144–55. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00722.2009.

Bakker, Emily, Harald Engan, Alexander Patrician, Erika Schagatay, Trine Karlsen, Ulrik Wisløff, and Svein Erik Gaustad. 2015. "Acute Dietary Nitrate Supplementation Improves Arterial Endothelial Function at High Altitude: A Double-Blinded Randomized Controlled Cross over Study." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 50 (August): 58–64. https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.08.006.

Balderas-Munoz, Karla, Lilia Castillo-Martínez, Arturo Orea-Tejeda, Oscar Infante-Vázquez, Marcelo Utrera-Lagunas, Raúl Martínez-Memije, Candace Keirns-Davis, Bryan Becerra-Luna, and Gabriela Sánchez-Vidal. 2012. "Improvement of Ventricular Function in Systolic Heart Failure Patients with Oral L-Citrulline Supplementation." *Cardiology Journal* 19 (6): 612–17.

Bassett, D. R., and E. T. Howley. 2000. "Limiting Factors for Maximum Oxygen Uptake and Determinants of Endurance Performance." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 32 (1): 70–84.

Beloucif, S., L. Beloucif, and D. Payen. 1991. "[Nitrate derivatives and anesthesia-resuscitation: physiopathologic bases and therapeutic indications]." *Cahiers D'anesthesiologie* 39 (4): 261–74.

Benetos, A., S. Laurent, A. P. Hoeks, P. H. Boutouyrie, and M. E. Safar. 1993. "Arterial Alterations with Aging and High Blood Pressure. A Noninvasive Study of Carotid and Femoral Arteries." *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology* 13 (1): 90–97.

Benjamin, N., F. O'Driscoll, H. Dougall, C. Duncan, L. Smith, M. Golden, and H. McKenzie. 1994. "Stomach NO Synthesis." *Nature* 368 (6471): 502. https://doi.org/10.1038/368502a0.

Bentley, Robert F., Jeremy J. Walsh, Patrick J. Drouin, Aleksandra Velickovic, Sarah J. Kitner, Alyssa M. Fenuta, and Michael E. Tschakovsky. 2017. "Dietary Nitrate Restores Compensatory Vasodilation and Exercise Capacity in Response to a Compromise in Oxygen Delivery in the Noncompensator Phenotype." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 123 (3): 594–605. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00953.2016.

Berry, Michael J., Nicholas W. Justus, Jordan I. Hauser, Ashlee H. Case, Christine C. Helms, Swati Basu, Zachary Rogers, Marc T. Lewis, and Gary D. Miller. 2015. "Dietary Nitrate Supplementation Improves Exercise Performance and Decreases Blood Pressure in COPD Patients." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 48 (August): 22–30. https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.10.007.

Bescós, Raúl, Antoni Sureda, Josep A. Tur, and Antoni Pons. 2012. "The Effect of Nitric-Oxide-Related Supplements on Human Performance." *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 42 (2): 99–117. https://doi.org/10.2165/11596860-000000000-00000.

Black, Mark A., N. Timothy Cable, Dick H. J. Thijssen, and Daniel J. Green. 2009. "Impact of Age, Sex, and Exercise on Brachial Artery Flow-Mediated Dilatation." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 297 (3): H1109–16. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00226.2009.

Bode-Böger, Stefanie M, Rainer H Böger, Andrea Galland, Dimitrios Tsikas, and Jürgen C Frölich. 1998. "L-Arginine-Induced Vasodilation in Healthy Humans: Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Relationship." *British Journal of Clinical Pharmacology* 46 (5): 489–97. https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00803.x.

Bondonno, Catherine P., Alex H. Liu, Kevin D. Croft, Natalie C. Ward, Xingbin Yang, Michael J. Considine, Ian B. Puddey, Richard J. Woodman, and Jonathan M. Hodgson. 2014. "Short-Term Effects of Nitrate-Rich Green Leafy Vegetables on Blood Pressure and Arterial Stiffness in Individuals with High-Normal Blood Pressure." *Free Radical Biology & Medicine* 77 (December): 353–62. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.021.

Boorsma, Robert K., Jamie Whitfield, and Lawrence L. Spriet. 2014. "Beetroot Juice Supplementation Does Not Improve Performance of Elite 1500-m Runners." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 46 (12): 2326–34. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000364.

Borutaité, V., and G. C. Brown. 1996. "Rapid Reduction of Nitric Oxide by Mitochondria, and Reversible Inhibition of Mitochondrial Respiration by Nitric Oxide." *The Biochemical Journal* 315 (Pt 1) (April): 295–99.

"Brain 93. XVI International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism. Sendai, Japan, 22-28 May 1993. Abstracts." 1993. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13 Suppl 1: S1-854.

Brandes, Ralf P., Ingrid Fleming, and Rudi Busse. 2005. "Endothelial Aging." *Cardiovascular Research* 66 (2): 286–94. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.12.027.

Breuillard, C., L. Cynober, and C. Moinard. 2015. "Citrulline and Nitrogen Homeostasis: An Overview." *Amino Acids* 47 (4): 685–91. https://doi.org/10.1007/s00726-015-1932-2.

Bryan, Nathan S., and John L. Ivy. 2015. "Inorganic Nitrite and Nitrate: Evidence to Support Consideration as Dietary Nutrients." *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 35 (8): 643–54. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.06.001.

Burnley, Mark, and Andrew M. Jones. 2007. "Oxygen Uptake Kinetics as a Determinant of Sports Performance." *European Journal of Sport Science* 7 (2): 63–79. https://doi.org/10.1080/17461390701456148.

Caplin, Ben, and James Leiper. 2012. "Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitors in the Biology of Disease: Markers, Mediators and Regulators?" *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (6): 1343–53. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.247726.

Carlström, Mattias, Ming Liu, Ting Yang, Christa Zollbrecht, Liyue Huang, Maria Peleli, Sara Borniquel, et al. 2015. "Cross-Talk Between Nitrate-Nitrite-NO and NO Synthase Pathways in Control of Vascular NO Homeostasis." *Antioxidants & Redox Signaling* 23 (4): 295–306. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5481.

Carriker, Colin R., Roger A. Vaughan, Trisha A. VanDusseldorp, Kelly E. Johnson, Nicholas M. Beltz, James J. McCormick, Nathan H. Cole, and Ann L. Gibson. 2016. "Nitrate-Containing Beetroot Juice Reduces Oxygen Consumption during Submaximal Exercise in Low but Not High Aerobically Fit Male Runners." *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 20 (4): 27–34. https://doi.org/10.20463/jenb.2016.0029.

Casey, Darren P., David P. Treichler, Charles T. Ganger, Aaron C. Schneider, and Kenichi Ueda. 2015. "Acute Dietary Nitrate Supplementation Enhances Compensatory Vasodilation during Hypoxic Exercise in Older Adults." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 118 (2): 178–86. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00662.2014.

Casey, Darren P., Kenichi Ueda, Lauren Wegman-Points, and Gary L. Pierce. 2017. "Muscle Contraction Induced Arterial Shear Stress Increases Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation in Humans." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 313 (4): H854–59. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00282.2017.

Casey, Darren P., Branton G. Walker, Sushant M. Ranadive, Jennifer L. Taylor, and Michael J. Joyner. 2013. "Contribution of Nitric Oxide in the Contraction-Induced Rapid Vasodilation in Young and Older Adults." *Journal of Applied Physiology* 115 (4): 446–55. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00446.2013.

Castello, Pablo R., Pamela S. David, Travis McClure, Zachary Crook, and Robert O. Poyton. 2006. “Mitochondrial Cytochrome Oxidase Produces Nitric Oxide under Hypoxic Conditions: Implications for Oxygen Sensing and Hypoxic Signaling in Eukaryotes.” *Cell Metabolism* 3 (4): 277–87. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.011.

Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, D. J. Spiegelhalter, D. Georgakopoulos, J. Robinson, and J. E. Deanfield. 1994. “Aging Is Associated with Endothelial Dysfunction in Healthy Men Years before the Age-Related Decline in Women.” *Journal of the American College of Cardiology* 24 (2): 471–76.

Cermak, Naomi M., Martin J. Gibala, and Luc J. C. van Loon. 2012. “Nitrate Supplementation’s Improvement of 10-Km Time-Trial Performance in Trained Cyclists.” *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 22 (1): 64–71.

Chamari, Karim, and Johnny Padulo. 2015. “‘Aerobic’ and ‘Anaerobic’ Terms Used in Exercise Physiology: A Critical Terminology Reflection.” *Sports Medicine - Open* 1 (March). https://doi.org/10.1186/s40798-015-0012-1.

Chin-Dusting, J. P. F., L. Willems, and D. M. Kaye. 2007. “L-Arginine Transporters in Cardiovascular Disease: A Novel Therapeutic Target.” *Pharmacology & Therapeutics* 116 (3): 428–36. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.001.

Christensen, P. M., M. Nyberg, and J. Bangsbo. 2013. “Influence of Nitrate Supplementation on VO_2 Kinetics and Endurance of Elite Cyclists.” *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 23 (1): e21-31. https://doi.org/10.1111/sms.12005.

Chung, Seockhoon, In-Young Yoon, Chul Hee Lee, and Jeong-Whun Kim. 2010. “The Association of Nocturnal Hypoxemia with Arterial Stiffness and Endothelial Dysfunction in Male Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome.” *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 79 (5): 363–69. https://doi.org/10.1159/000228905.

Churchward-Venne, Tyler A., Lisa M. Cotie, Maureen J. MacDonald, Cameron J. Mitchell, Todd Prior, Steven K. Baker, and Stuart M. Phillips. 2014. “Citrulline Does Not Enhance Blood Flow, Microvascular Circulation, or Myofibrillar Protein Synthesis in Elderly Men at Rest or Following Exercise.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 307 (1): E71-83. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00096.2014.

Clifford, Tom, Glyn Howatson, Daniel J. West, and Emma J. Stevenson. 2017. “Beetroot Juice Is More Beneficial than Sodium Nitrate for Attenuating Muscle Pain after Strenuous Eccentric-Bias Exercise.” *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 42 (11): 1185–91. https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0238.

Coggan, Andrew R., Joshua L. Leibowitz, Ana Kadkhodayan, Deepak P. Thomas, Sujata Ramamurthy, Catherine Anderson Spearie, Suzanne Waller, Marsha Farmer, and Linda R. Peterson. 2015. “Effect of Acute Dietary Nitrate Intake on Maximal Knee Extensor Speed and Power in Healthy Men and Women.” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 48 (August): 16–21. https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.08.014.

Collier, Scott R., Darren P. Casey, and Jill A. Kanaley. 2005. “Growth Hormone Responses to Varying Doses of Oral Arginine.” *Growth Hormone & IGF Research* 15 (2): 136–39. https://doi.org/10.1016/j.ghir.2004.12.004.

Cooke, J. P. 2000. “Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction?” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (9): 2032–37.

Craig, Jesse C., Ryan M. Broxterman, Joshua R. Smith, Jason D. Allen, and Thomas J. Barstow. 2018. "Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Conduit Artery Blood Flow, Muscle Oxygenation, and Metabolic Rate during Handgrip Exercise." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 125 (2): 254–62. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00772.2017.

Cumpstey, Andrew F., Philip J. Hennis, Edward T. Gilbert-Kawai, Bernadette O. Fernandez, Matthieu Poudevigne, Alexandra Cobb, Paula Meale, et al. 2017. "Effects of Dietary Nitrate on Respiratory Physiology at High Altitude - Results from the Xtreme Alps Study." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 71 (December): 57–68. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.005.

Cutrufello, Paul T., Stephen J. Gadomski, and Gerald S. Zavorsky. 2015. "The Effect of L-Citrulline and Watermelon Juice Supplementation on Anaerobic and Aerobic Exercise Performance." *Journal of Sports Sciences* 33 (14): 1459–66. https://doi.org/10.1080/02640414.2014.990495.

Cynober, Luc. 2007. "Pharmacokinetics of Arginine and Related Amino Acids." *The Journal of Nutrition* 137 (6 Suppl 2): 1646S-1649S. https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1646S.

Cynober, Luc, Jean-Pascal de Bandt, and Christophe Moinard. 2013. "Leucine and Citrulline: Two Major Regulators of Protein Turnover." *World Review of Nutrition and Dietetics* 105: 97–105. https://doi.org/10.1159/000341278.

Dawson, T. M., and S. H. Snyder. 1994. "Gases as Biological Messengers: Nitric Oxide and Carbon Monoxide in the Brain." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (9): 5147–59.

De Smet, Stefan, Ruud Van Thienen, Louise Deldicque, Ruth James, Craig Sale, David J. Bishop, and Peter Hespel. 2016. "Nitrate Intake Promotes Shift in Muscle Fiber Type Composition during Sprint Interval Training in Hypoxia." *Frontiers in Physiology* 7: 233. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00233.

Dejam, André, Christian J. Hunter, Mildred M. Pelletier, Lewis L. Hsu, Roberto F. Machado, Sruti Shiva, Gordon G. Power, Malte Kelm, Mark T. Gladwin, and Alan N. Schechter. 2005. "Erythrocytes Are the Major Intravascular Storage Sites of Nitrite in Human Blood." *Blood* 106 (2): 734–39. https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0567.

Demchenko, Ivan T., Yuriy I. Luchakov, Alexander N. Moskvin, Diana R. Gutsaeva, Barry W. Allen, Edward D. Thalmann, and Claude A. Piantadosi. 2005. "Cerebral Blood Flow and Brain Oxygenation in Rats Breathing Oxygen under Pressure." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25 (10): 1288–1300. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600110.

Devries, Michaela C., Leigh Breen, Mark Von Allmen, Maureen J. MacDonald, Daniel R. Moore, Elizabeth A. Offord, Marie-Noëlle Horcajada, Denis Breuillé, and Stuart M. Phillips. 2015. "Low-Load Resistance Training during Step-Reduction Attenuates Declines in Muscle Mass and Strength and Enhances Anabolic Sensitivity in Older Men." *Physiological Reports* 3 (8). https://doi.org/10.14814/phy2.12493.

Doel, Justin Johnston, Nigel Benjamin, Mark Pritchard Hector, Michael Rogers, and Robert Patrick Allaker. 2005. "Evaluation of Bacterial Nitrate Reduction in the Human Oral Cavity." *European Journal of Oral Sciences* 113 (1): 14–19. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00184.x.

Domínguez, Raúl, José Luis Maté-Muñoz, Eduardo Cuenca, Pablo García-Fernández, Fernando Mata-Ordoñez, María Carmen Lozano-Estevan, Pablo Veiga-Herreros,

Sandro Fernandes da Silva, and Manuel Vicente Garnacho-Castaño. 2018. "Effects of Beetroot Juice Supplementation on Intermittent High-Intensity Exercise Efforts." *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 15 (1). https://doi.org/10.1186/s12970-017-0204-9.

Dong, Jia-Yi, Li-Qiang Qin, Zengli Zhang, Youyou Zhao, Junkuan Wang, Fabrizio Arigoni, and Weiguo Zhang. 2011. "Effect of Oral L-Arginine Supplementation on Blood Pressure: A Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials." *American Heart Journal* 162 (6): 959–65. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2011.09.012.

Dormanns, K., R. G. Brown, and T. David. 2016. "The Role of Nitric Oxide in Neurovascular Coupling." *Journal of Theoretical Biology* 394 (April): 1–17. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.01.009.

Doutreleau, Stéphane, Olivier Rouyer, Paola Di Marco, Evelyne Lonsdorfer, Ruddy Richard, François Piquard, and Bernard Geny. 2010. "L-Arginine Supplementation Improves Exercise Capacity after a Heart Transplant." *The American Journal of Clinical Nutrition* 91 (5): 1261–67. https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27881.

Drake, Carrie T., and Costantino Iadecola. 2007. "The Role of Neuronal Signaling in Controlling Cerebral Blood Flow." *Brain and Language*, Activation in Functional Imaging, 102 (2): 141–52. https://doi.org/10.1016/j.bandl.2006.08.002.

Duncan, C., H. Dougall, P. Johnston, S. Green, R. Brogan, C. Leifert, L. Smith, M. Golden, and N. Benjamin. 1995. "Chemical Generation of Nitric Oxide in the Mouth from the Enterosalivary Circulation of Dietary Nitrate." *Nature Medicine* 1 (6): 546–51.

Džoljić, Eleonora, Ivan Grabatinić, and Vladimir Kostić. 2015. "Why Is Nitric Oxide Important for Our Brain?" *Functional Neurology* 30 (3): 159–63. https://doi.org/10.11138/FNeur/2015.30.3.159.

Eggebeen, Joel, Daniel B. Kim-Shapiro, Mark Haykowsky, Timothy M. Morgan, Swati Basu, Peter Brubaker, Jack Rejeski, and Dalane W. Kitzman. 2016. "One Week of Daily Dosing With Beetroot Juice Improves Submaximal Endurance and Blood Pressure in Older Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction." *JACC. Heart Failure* 4 (6): 428–37. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2015.12.013.

El-Hattab, Ayman W., Lisa T. Emrick, William J. Craigen, and Fernando Scaglia. 2012. "Citrulline and Arginine Utility in Treating Nitric Oxide Deficiency in Mitochondrial Disorders." *Molecular Genetics and Metabolism* 107 (3): 247–52. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.06.018.

Faure, Cécile, Agathe Raynaud-Simon, Arnaud Ferry, Valérie Daugé, Luc Cynober, Christian Aussel, and Christophe Moinard. 2012. "Leucine and Citrulline Modulate Muscle Function in Malnourished Aged Rats." *Amino Acids* 42 (4): 1425–33. https://doi.org/10.1007/s00726-011-0841-2.

Ferguson, Scott K., Daniel M. Hirai, Steven W. Copp, Clark T. Holdsworth, Jason D. Allen, Andrew M. Jones, Timothy I. Musch, and David C. Poole. 2013. "Impact of Dietary Nitrate Supplementation via Beetroot Juice on Exercising Muscle Vascular Control in Rats." *The Journal of Physiology* 591 (2): 547–57. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.243121.

Figueroa, Arturo, Stacey Alvarez-Alvarado, Michael J. Ormsbee, Takudzwa A. Madzima, Jeremiah C. Campbell, and Alexei Wong. 2015. "Impact of L-Citrulline Supplementation and Whole-Body Vibration Training on Arterial Stiffness and Leg Muscle Function in Obese Postmenopausal Women with High Blood Pressure."

Experimental Gerontology 63 (March): 35–40. https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.01.046.

Figueroa, Arturo, Marcos A. Sanchez-Gonzalez, Alexei Wong, and Bahram H. Arjmandi. 2012. "Watermelon Extract Supplementation Reduces Ankle Blood Pressure and Carotid Augmentation Index in Obese Adults with Prehypertension or Hypertension." *American Journal of Hypertension* 25 (6): 640–43. https://doi.org/10.1038/ajh.2012.20.

Figueroa, Arturo, Julian A. Trivino, Marcos A. Sanchez-Gonzalez, and Florence Vicil. 2010. "Oral L-Citrulline Supplementation Attenuates Blood Pressure Response to Cold Pressor Test in Young Men." *American Journal of Hypertension* 23 (1): 12–16. https://doi.org/10.1038/ajh.2009.195.

Figueroa, Arturo, Alexei Wong, Shirin Hooshmand, and Marcos Angel Sanchez-Gonzalez. 2013. "Effects of Watermelon Supplementation on Arterial Stiffness and Wave Reflection Amplitude in Postmenopausal Women." *Menopause (New York, N.Y.)* 20 (5): 573–77. https://doi.org/10.1097/GME.0b013e3182733794.

Figueroa, Arturo, Alexei Wong, Salvador J. Jaime, and Joaquin U. Gonzales. 2017. "Influence of L-Citrulline and Watermelon Supplementation on Vascular Function and Exercise Performance." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 20 (1): 92–98. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000340.

Flueck, Joelle Leonie, Anna Bogdanova, Samuel Mettler, and Claudio Perret. 2016. "Is Beetroot Juice More Effective than Sodium Nitrate? The Effects of Equimolar Nitrate Dosages of Nitrate-Rich Beetroot Juice and Sodium Nitrate on Oxygen Consumption during Exercise." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 41 (4): 421–29. https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0458.

Förstermann, Ulrich, Ning Xia, and Huige Li. 2017. "Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis." *Circulation Research* 120 (4): 713–35. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.

Forte, P., M. Copland, L. M. Smith, E. Milne, J. Sutherland, and N. Benjamin. 1997. "Basal Nitric Oxide Synthesis in Essential Hypertension." *Lancet (London, England)* 349 (9055): 837–42. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)07631-3.

Fuglevand, A. J., K. M. Zackowski, K. A. Huey, and R. M. Enoka. 1993. "Impairment of Neuromuscular Propagation during Human Fatiguing Contractions at Submaximal Forces." *The Journal of Physiology* 460 (January): 549–72.

Fuhr, P., R. Agostino, and M. Hallett. 1991. "Spinal Motor Neuron Excitability during the Silent Period after Cortical Stimulation." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 81 (4): 257–62.

Fulford, Jonathan, Paul G. Winyard, Anni Vanhatalo, Stephen J. Bailey, Jamie R. Blackwell, and Andrew M. Jones. 2013. "Influence of Dietary Nitrate Supplementation on Human Skeletal Muscle Metabolism and Force Production during Maximum Voluntary Contractions." *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 465 (4): 517–28. https://doi.org/10.1007/s00424-013-1220-5.

Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. 1980. "The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine." *Nature* 288 (5789): 373–76.

Gandevia, S. C. 2001. "Spinal and Supraspinal Factors in Human Muscle Fatigue." *Physiological Reviews* 81 (4): 1725–89. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1725.

Gandevia, S C, G M Allen, J E Butler, and J L Taylor. 1996. “Supraspinal Factors in Human Muscle Fatigue: Evidence for Suboptimal Output from the Motor Cortex.” *The Journal of Physiology* 490 (Pt 2): 529–36.

Gangar, K. F., S. Vyas, M. Whitehead, D. Crook, H. Meire, and S. Campbell. 1991. “Pulsatility Index in Internal Carotid Artery in Relation to Transdermal Oestradiol and Time since Menopause.” *Lancet (London, England)* 338 (8771): 839–42.

Gangolli, S. D., P. A. van den Brandt, V. J. Feron, C. Janzowsky, J. H. Koeman, G. J. Speijers, B. Spiegelhalder, R. Walker, and J. S. Wisnok. 1994. “Nitrate, Nitrite and N-Nitroso Compounds.” *European Journal of Pharmacology* 292 (1): 1–38.

García-Cardeña, G., P. Martasek, B. S. Masters, P. M. Skidd, J. Couet, S. Li, M. P. Lisanti, and W. C. Sessa. 1997. “Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin. Functional Significance of the Nos Caveolin Binding Domain in Vivo.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (41): 25437–40.

Garry, P. S., M. Ezra, M. J. Rowland, J. Westbrook, and K. T. S. Pattinson. 2015. “The Role of the Nitric Oxide Pathway in Brain Injury and Its Treatment — From Bench to Bedside.” *Experimental Neurology* 263 (Supplement C): 235–43. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.10.017.

Gasier, Heath G., Anthony R. Reinhold, Allison R. Loiselle, Shawn E. Soutiere, and David M. Fothergill. 2017. “Effects of Oral Sodium Nitrate on Forearm Blood Flow, Oxygenation and Exercise Performance during Acute Exposure to Hypobaric Hypoxia (4300 M).” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 69 (September): 1–9. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.07.001.

Gates, Phillip E., Meghan L. Boucher, Annemarie E. Silver, Kevin D. Monahan, and Douglas R. Seals. 2007. “Impaired Flow-Mediated Dilation with Age Is Not Explained by L-Arginine Bioavailability or Endothelial Asymmetric Dimethylarginine Protein Expression.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 102 (1): 63–71. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00660.2006.

Gavin, T. P., D. A. Spector, H. Wagner, E. C. Breen, and P. D. Wagner. 2000. “Nitric Oxide Synthase Inhibition Attenuates the Skeletal Muscle VEGF MRNA Response to Exercise.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 88 (4): 1192–98. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1192.

Ghosh, Suborno M., Vikas Kapil, Isabel Fuentes-Calvo, Kristen J. Bubb, Vanessa Pearl, Alexandra B. Milsom, Rayomand Khambata, et al. 2013. “Enhanced Vasodilator Activity of Nitrite in Hypertension: Critical Role for Erythrocytic Xanthine Oxidoreductase and Translational Potential.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 61 (5): 1091–1102. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00933.

Gijsbers, L., J. I. Dower, M. Mensink, E. Siebelink, S. J. L. Bakker, and J. M. Geleijnse. 2015. “Effects of Sodium and Potassium Supplementation on Blood Pressure and Arterial Stiffness: A Fully Controlled Dietary Intervention Study.” *Journal of Human Hypertension* 29 (10): 592–98. https://doi.org/10.1038/jhh.2015.3.

Gilchrist, Mark, Paul G. Winyard, Jon Fulford, Christine Anning, Angela C. Shore, and Nigel Benjamin. 2014. “Dietary Nitrate Supplementation Improves Reaction Time in Type 2 Diabetes: Development and Application of a Novel Nitrate-Depleted Beetroot Juice Placebo.” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 40 (August): 67–74. https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.05.003.

Gilligan, D. M., J. A. Panza, C. M. Kilcoyne, M. A. Waclawiw, P. R. Casino, and A. A. Quyyumi. 1994. “Contribution of Endothelium-Derived Nitric Oxide to Exercise-Induced Vasodilation.” *Circulation* 90 (6): 2853–58.

Gladwin, Mark T., Alan N. Schechter, Daniel B. Kim-Shapiro, Rakesh P. Patel, Neil Hogg, Sruti Shiva, Richard O. Cannon, et al. 2005. “The Emerging Biology of the Nitrite Anion.” *Nature Chemical Biology* 1 (6): 308–14. https://doi.org/10.1038/nchembio1105-308.

Gonzales, Joaquin U., Andrea Raymond, John Ashley, and Youngdeok Kim. 2017. “Does L-Citrulline Supplementation Improve Exercise Blood Flow in Older Adults?” *Experimental Physiology* 102 (12): 1661–71. https://doi.org/10.1113/EP086587.

Goodall, S., L. M. Romer, and E. Z. Ross. 2009. “Voluntary Activation of Human Knee Extensors Measured Using Transcranial Magnetic Stimulation.” *Experimental Physiology* 94 (9): 995–1004. https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.047902.

Goron, Arthur, Frédéric Lamarche, Valérie Cunin, Hervé Dubouchaud, Christophe Hourdé, Philippe Noirez, Christelle Corne, et al. 2017. “Synergistic Effects of Citrulline Supplementation and Exercise on Performance in Male Rats: Evidence for Implication of Protein and Energy Metabolisms.” *Clinical Science (London, England: 1979)* 131 (8): 775–90. https://doi.org/10.1042/CS20170088.

Granger, D. Neil, Lena Holm, and Peter Kvietys. 2015. “The Gastrointestinal Circulation: Physiology and Pathophysiology.” *Comprehensive Physiology* 5 (3): 1541–83. https://doi.org/10.1002/cphy.c150007.

Gray, Benjamin J., Jeffrey W. Stephens, Sally P. Williams, Christine A. Davies, Daniel Turner, Richard M. Bracken, and Prosiect Sir Gâr Group. 2015. “Cardiorespiratory Fitness Is a Stronger Indicator of Cardiometabolic Risk Factors and Risk Prediction than Self-Reported Physical Activity Levels.” *Diabetes & Vascular Disease Research* 12 (6): 428–35. https://doi.org/10.1177/1479164115599907.

Green, Daniel J., Andrew Maiorana, Gerry O’Driscoll, and Roger Taylor. 2004. “Effect of Exercise Training on Endothelium-Derived Nitric Oxide Function in Humans.” *The Journal of Physiology* 561 (Pt 1): 1–25. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068197.

Grimble, George K. 2007. “Adverse Gastrointestinal Effects of Arginine and Related Amino Acids.” *The Journal of Nutrition* 137 (6 Suppl 2): 1693S-1701S. https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1693S.

Groppa, S., A. Oliviero, A. Eisen, A. Quartarone, L. G. Cohen, V. Mall, A. Kaelin-Lang, et al. 2012. “A Practical Guide to Diagnostic Transcranial Magnetic Stimulation: Report of an IFCN Committee.” *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 123 (5): 858–82. https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.01.010.

Gruet, M., J. Temesi, J. Brisswalter, G. Y. Millet, and S. Vergès. 2014. “Stimulation Magnétique Transcrânienne : Application à La Physiologie de l’exercice.” *Science & Sports* 29 (4): 173–87. https://doi.org/10.1016/j.scispo.2014.04.002.

Gruet, M., J. Temesi, T. Rupp, P. Levy, G. Y. Millet, and S. Verges. 2013. “Stimulation of the Motor Cortex and Corticospinal Tract to Assess Human Muscle Fatigue.” *Neuroscience* 231 (February): 384–99. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.058.

Haider, Georg, and Jonathan P. Folland. 2014. “Nitrate Supplementation Enhances the Contractile Properties of Human Skeletal Muscle.” *Medicine and Science in Sports and Exercise* 46 (12): 2234–43. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000351.

Halcox, Julian P. J., William H. Schenke, Gloria Zalos, Rita Mincemoyer, Abhiram Prasad, Myron A. Waclawiw, Khaled R. A. Nour, and Arshed A. Quyyumi. 2002. "Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction." *Circulation* 106 (6): 653–58.

Hardy, Thomas A., and James M. May. 2002. "Coordinate Regulation of L-Arginine Uptake and Nitric Oxide Synthase Activity in Cultured Endothelial Cells." *Free Radical Biology & Medicine* 32 (2): 122–31.

Heiss, Christian, Christian Meyer, Matthias Totzeck, Ulrike B. Hendgen-Cotta, Yvonne Heinen, Peter Luedike, Stefanie Keymel, et al. 2012. "Dietary Inorganic Nitrate Mobilizes Circulating Angiogenic Cells." *Free Radical Biology & Medicine* 52 (9): 1767–72. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.051.

Hernández, Andrés, Tomas A Schiffer, Niklas Ivarsson, Arthur J Cheng, Joseph D Bruton, Jon O Lundberg, Eddie Weitzberg, and Håkan Westerblad. 2012. "Dietary Nitrate Increases Tetanic [Ca2+]i and Contractile Force in Mouse Fast-Twitch Muscle." *The Journal of Physiology* 590 (Pt 15): 3575–83. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.232777.

Hezel, M. P., and E. Weitzberg. 2015. "The Oral Microbiome and Nitric Oxide Homoeostasis." *Oral Diseases* 21 (1): 7–16. https://doi.org/10.1111/odi.12157.

Hirst, David G., and Tracy Robson. 2011. "Nitric Oxide Physiology and Pathology." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 704: 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-964-2_1.

Hong, Kwang-Seok, and Kijeong Kim. 2017. "Skeletal Muscle Contraction-Induced Vasodilation in the Microcirculation." *Journal of Exercise Rehabilitation* 13 (5): 502–7. https://doi.org/10.12965/jer.1735114.557.

Hoon, Matthew W., Ché Fornusek, Phillip G. Chapman, and Nathan A. Johnson. 2015. "The Effect of Nitrate Supplementation on Muscle Contraction in Healthy Adults." *European Journal of Sport Science* 15 (8): 712–19. https://doi.org/10.1080/17461391.2015.1053418.

Hoon, Matthew W., William G. Hopkins, Andrew M. Jones, David T. Martin, Shona L. Halson, Nicholas P. West, Nathan A. Johnson, and Louise M. Burke. 2014. "Nitrate Supplementation and High-Intensity Performance in Competitive Cyclists." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 39 (9): 1043–49. https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0574.

Hoon, Matthew W., Nathan A. Johnson, Phillip G. Chapman, and Louise M. Burke. 2013. "The Effect of Nitrate Supplementation on Exercise Performance in Healthy Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis." *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 23 (5): 522–32.

Hord, Norman G., Yaoping Tang, and Nathan S. Bryan. 2009. "Food Sources of Nitrates and Nitrites: The Physiologic Context for Potential Health Benefits." *The American Journal of Clinical Nutrition* 90 (1): 1–10. https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131.

"How Is Blood Channeled toward the Most Active Areas of the Brain? - Quora." n.d. Accessed October 5, 2018. https://www.quora.com/How-is-blood-channeled-toward-the-most-active-areas-of-the-brain.

Huang, Zhi, Sruti Shiva, Daniel B. Kim-Shapiro, Rakesh P. Patel, Lorna A. Ringwood, Cynthia E. Irby, Kris T. Huang, et al. 2005. "Enzymatic Function of Hemoglobin as a Nitrite Reductase That Produces NO under Allosteric Control." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (8): 2099–2107. https://doi.org/10.1172/JCI24650.

Hunter, Christian J., André Dejam, Arlin B. Blood, Howard Shields, Daniel B. Kim-Shapiro, Roberto F. Machado, Selamawit Tarekegn, et al. 2004. "Inhaled Nebulized Nitrite Is a Hypoxia-Sensitive NO-Dependent Selective Pulmonary Vasodilator." *Nature Medicine* 10 (10): 1122–27. https://doi.org/10.1038/nm1109.

Hunter, Sandra K., Jane E. Butler, Gabrielle Todd, Simon C. Gandevia, and Janet L. Taylor. 2006. "Supraspinal Fatigue Does Not Explain the Sex Difference in Muscle Fatigue of Maximal Contractions." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 101 (4): 1036–44. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00103.2006.

Iadecola, C. 1993. "Regulation of the Cerebral Microcirculation during Neural Activity: Is Nitric Oxide the Missing Link?" *Trends in Neurosciences* 16 (6): 206–14.

Iadecola, C., and X. Xu. 1994. "Nitro-L-Arginine Attenuates Hypercapnic Cerebrovasodilation without Affecting Cerebral Metabolism." *The American Journal of Physiology* 266 (2 Pt 2): R518-525. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.2.R518.

Ignarro, L. J. 1990. "Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30: 535–60. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.002535.

Jackson, Jacklyn K., Amanda J. Patterson, Lesley K. MacDonald-Wicks, Christopher Oldmeadow, and Mark A. McEvoy. 2018. "The Role of Inorganic Nitrate and Nitrite in Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Human Evidence." *Nutrition Reviews* 76 (5): 348–71. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy005.

Jajja, A., A. Sutyarjoko, J. Lara, K. Rennie, K. Brandt, O. Qadir, and M. Siervo. 2014. "Beetroot Supplementation Lowers Daily Systolic Blood Pressure in Older, Overweight Subjects." *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 34 (10): 868–75. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.09.007.

Jensen, L., J. Bangsbo, and Y. Hellsten. 2004. "Effect of High Intensity Training on Capillarization and Presence of Angiogenic Factors in Human Skeletal Muscle." *The Journal of Physiology* 557 (Pt 2): 571–82. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.057711.

Jensen-Urstad, K., and J. Johansson. 2001. "Gender Difference in Age-Related Changes in Vascular Function." *Journal of Internal Medicine* 250 (1): 29–36.

Jones, Andrew M., Christopher Thompson, Lee J. Wylie, and Anni Vanhatalo. 2018. "Dietary Nitrate and Physical Performance." *Annual Review of Nutrition* 38 (1): 303–28. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051622.

Jones, N. L., and K. J. Killian. 2000. "Exercise Limitation in Health and Disease." *The New England Journal of Medicine* 343 (9): 632–41. https://doi.org/10.1056/NEJM200008313430907.

Jonvik, Kristin L., Jean Nyakayiru, Philippe Jm Pinckaers, Joan Mg Senden, Luc Jc van Loon, and Lex B. Verdijk. 2016. "Nitrate-Rich Vegetables Increase Plasma Nitrate and Nitrite Concentrations and Lower Blood Pressure in Healthy Adults." *The Journal of Nutrition* 146 (5): 986–93. https://doi.org/10.3945/jn.116.229807.

Jourdan, Marion, K. Sreekumaran Nair, Rickey E. Carter, Jill Schimke, G. Charles Ford, Julie Marc, Christian Aussel, and Luc Cynober. 2015. "Citrulline Stimulates Muscle Protein Synthesis in the Post-Absorptive State in Healthy People Fed a Low-Protein Diet - A Pilot Study." *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 34 (3): 449–56. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.04.019.

Joyner, Michael J., and Darren P. Casey. 2014. “Muscle Blood Flow, Hypoxia, and Hypoperfusion.” *Journal of Applied Physiology* 116 (7): 852–57. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00620.2013.

Kamga, Christelle, Suhas Krishnamurthy, and Sruti Shiva. 2012. “Myoglobin and Mitochondria: A Relationship Bound by Oxygen and Nitric Oxide.” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 26 (4): 251–58. https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.005.

Kapil, V., E. Weitzberg, J. O. Lundberg, and A. Ahluwalia. 2014. “Clinical Evidence Demonstrating the Utility of Inorganic Nitrate in Cardiovascular Health.” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 38 (April): 45–57. https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.03.162.

Kapil, Vikas, Rayomand S. Khambata, Amy Robertson, Mark J. Caulfield, and Amrita Ahluwalia. 2015. “Dietary Nitrate Provides Sustained Blood Pressure Lowering in Hypertensive Patients: A Randomized, Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled Study.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 65 (2): 320–27. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04675.

Kapil, Vikas, Alexandra B. Milsom, Michael Okorie, Sheiva Maleki-Toyserkani, Farihah Akram, Farkhanda Rehman, Shah Arghandawi, et al. 2010a. “Inorganic Nitrate Supplementation Lowers Blood Pressure in Humans: Role for Nitrite-Derived NO.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 56 (2): 274–81. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536.

———. 2010b. “Inorganic Nitrate Supplementation Lowers Blood Pressure in Humans: Role for Nitrite-Derived NO.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 56 (2): 274–81. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536.

Katayama, Keisho, Osamu Fujita, Motoyuki Iemitsu, Hiroshi Kawano, Erika Iwamoto, Mitsuru Saito, and Koji Ishida. 2013. “The Effect of Acute Exercise in Hypoxia on Flow-Mediated Vasodilation.” *European Journal of Applied Physiology* 113 (2): 349–57. https://doi.org/10.1007/s00421-012-2442-5.

Kelly, James, Jonathan Fulford, Anni Vanhatalo, Jamie R. Blackwell, Olivia French, Stephen J. Bailey, Mark Gilchrist, Paul G. Winyard, and Andrew M. Jones. 2013. “Effects of Short-Term Dietary Nitrate Supplementation on Blood Pressure, O2 Uptake Kinetics, and Muscle and Cognitive Function in Older Adults.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 304 (2): R73-83. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00406.2012.

Kelly, James, Anni Vanhatalo, Stephen J. Bailey, Lee J. Wylie, Christopher Tucker, Stephen List, Paul G. Winyard, and Andrew M. Jones. 2014. “Dietary Nitrate Supplementation: Effects on Plasma Nitrite and Pulmonary O2 Uptake Dynamics during Exercise in Hypoxia and Normoxia.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (7): R920-930. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00068.2014.

Kenjale, Aarti A., Katherine L. Ham, Thomas Stabler, Jennifer L. Robbins, Johanna L. Johnson, Mitch Vanbruggen, Grayson Privette, Eunji Yim, William E. Kraus, and Jason D. Allen. 2011. “Dietary Nitrate Supplementation Enhances Exercise Performance in Peripheral Arterial Disease.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 110 (6): 1582–91. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00071.2011.

Kielstein, Jan T., Burcu Impraim, Solveig Simmel, Stefanie M. Bode-Böger, Dimitrios Tsikas, Jürgen C. Frölich, Marius M. Hoeper, Hermann Haller, and Danilo Fliser. 2004. “Cardiovascular Effects of Systemic Nitric Oxide Synthase Inhibition with

Asymmetrical Dimethylarginine in Humans." *Circulation* 109 (2): 172–77. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000105764.22626.B1.

Kim, Il-Young, Scott E. Schutzler, Amy Schrader, Horace J. Spencer, Gohar Azhar, Nicolaas E. P. Deutz, and Robert R. Wolfe. 2015. "Acute Ingestion of Citrulline Stimulates Nitric Oxide Synthesis but Does Not Increase Blood Flow in Healthy Young and Older Adults with Heart Failure." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 309 (11): E915-924. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00339.2015.

Kim, Jeong-a, Monica Montagnani, Kwang Kon Koh, and Michael J. Quon. 2006. "Reciprocal Relationships between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Molecular and Pathophysiological Mechanisms." *Circulation* 113 (15): 1888–1904. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213.

Kim, Jin-Kwang, David J. Moore, David G. Maurer, Daniel B. Kim-Shapiro, Swati Basu, Michael P. Flanagan, Ann C. Skulas-Ray, Penny Kris-Etherton, and David N. Proctor. 2014. "Acute Dietary Nitrate Supplementation Does Not Augment Submaximal Forearm Exercise Hyperemia in Healthy Young Men." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 40 (2): 122–28. https://doi.org/10.1139/apnm-2014-0228.

Kim-Shapiro, Daniel B., Alan N. Schechter, and Mark T. Gladwin. 2006. "Unraveling the Reactions of Nitric Oxide, Nitrite, and Hemoglobin in Physiology and Therapeutics." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (4): 697–705. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a.

King, Dana E., Arch G. Mainous, and Mark E. Geesey. 2008. "Variation in L-Arginine Intake Follow Demographics and Lifestyle Factors That May Impact Cardiovascular Disease Risk." *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 28 (1): 21–24. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2007.11.003.

Kouzaki, Karina, Kazunori Nosaka, Eisuke Ochi, and Koichi Nakazato. 2016. "Increases in M-Wave Latency of Biceps Brachii after Elbow Flexor Eccentric Contractions in Women." *European Journal of Applied Physiology* 116 (5): 939–46. https://doi.org/10.1007/s00421-016-3358-2.

Kufel, Thomas J., Lilibeth A. Pineda, and M. Jeffery Mador. 2002. "Comparison of Potentiated and Unpotentiated Twitches as an Index of Muscle Fatigue." *Muscle & Nerve* 25 (3): 438–44.

Kuru, Oktay, Umit Kemal Sentürk, Günnur Koçer, Sadi Ozdem, Oğuz K. Başkurt, Arzu Cetin, Akin Yeşilkaya, and Filiz Gündüz. 2009. "Effect of Exercise Training on Resistance Arteries in Rats with Chronic NOS Inhibition." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 107 (3): 896–902. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91180.2008.

Lakens, Daniël. 2013. "Calculating and Reporting Effect Sizes to Facilitate Cumulative Science: A Practical Primer for t-Tests and ANOVAs." *Frontiers in Psychology* 4 (November). https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863.

Lane, Stephen C., John A. Hawley, Ben Desbrow, Andrew M. Jones, James R. Blackwell, Megan L. Ross, Adam J. Zemski, and Louise M. Burke. 2014. "Single and Combined Effects of Beetroot Juice and Caffeine Supplementation on Cycling Time Trial Performance." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 39 (9): 1050–57. https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0336.

Lang, John D., Xinjun Teng, Phillip Chumley, Jack H. Crawford, T. Scott Isbell, Balu K. Chacko, Yuliang Liu, et al. 2007. "Inhaled NO Accelerates Restoration of Liver Function in

Adults Following Orthotopic Liver Transplantation." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (9): 2583–91. https://doi.org/10.1172/JCI31892.

Lansley, Katherine E., Paul G. Winyard, Stephen J. Bailey, Anni Vanhatalo, Daryl P. Wilkerson, Jamie R. Blackwell, Mark Gilchrist, Nigel Benjamin, and Andrew M. Jones. 2011. "Acute Dietary Nitrate Supplementation Improves Cycling Time Trial Performance." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 43 (6): 1125–31. https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31821597b4.

Lara, Jose, Ammar W. Ashor, C. Oggioni, A. Ahluwalia, John C. Mathers, and Mario Siervo. 2016. "Effects of Inorganic Nitrate and Beetroot Supplementation on Endothelial Function: A Systematic Review and Meta-Analysis." *European Journal of Nutrition* 55 (2): 451–59. https://doi.org/10.1007/s00394-015-0872-7.

Lara, Jose, Ikponmwonsa Ogbonmwan, Clio Oggioni, Dingchang Zheng, Othman Qadir, Ammar Ashor, Kirsten Brandt, John C. Mathers, and Mario Siervo. 2015. "Effects of Handgrip Exercise or Inorganic Nitrate Supplementation on 24-h Ambulatory Blood Pressure and Peripheral Arterial Function in Overweight and Obese Middle Age and Older Adults: A Pilot RCT." *Maturitas* 82 (2): 228–35. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.07.028.

Larsen, F. J., E. Weitzberg, J. O. Lundberg, and B. Ekblom. 2007. "Effects of Dietary Nitrate on Oxygen Cost during Exercise." *Acta Physiologica (Oxford, England)* 191 (1): 59–66. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01713.x.

Larsen, Filip J., Björn Ekblom, Kent Sahlin, Jon O. Lundberg, and Eddie Weitzberg. 2006. "Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers." *The New England Journal of Medicine* 355 (26): 2792–93. https://doi.org/10.1056/NEJMc062800.

Larsen, Filip J., Tomas A. Schiffer, Sara Borniquel, Kent Sahlin, Björn Ekblom, Jon O. Lundberg, and Eddie Weitzberg. 2011. "Dietary Inorganic Nitrate Improves Mitochondrial Efficiency in Humans." *Cell Metabolism* 13 (2): 149–59. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.004.

Larsen, Filip J., Eddie Weitzberg, Jon O. Lundberg, and Björn Ekblom. 2010. "Dietary Nitrate Reduces Maximal Oxygen Consumption While Maintaining Work Performance in Maximal Exercise." *Free Radical Biology & Medicine* 48 (2): 342–47. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.006.

Larsen, Thomas, Frank Holden Mose, Jesper Noergaard Bech, and Erling Bjerregaard Pedersen. 2012. "Effect of Nitric Oxide Inhibition on Blood Pressure and Renal Sodium Handling: A Dose-Response Study in Healthy Man." *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 34 (8): 567–74. https://doi.org/10.3109/10641963.2012.681727.

Lauer, Thomas, Christian Heiss, Jan Balzer, Eva Kehmeier, Sarah Mangold, Thorsten Leyendecker, Jessica Rottler, et al. 2008. "Age-Dependent Endothelial Dysfunction Is Associated with Failure to Increase Plasma Nitrite in Response to Exercise." *Basic Research in Cardiology* 103 (3): 291–97. https://doi.org/10.1007/s00395-008-0714-3.

Laurent, Stéphane, Pierre Boutouyrie, and Patrick Lacolley. 2005. "Structural and Genetic Bases of Arterial Stiffness." *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 45 (6): 1050–55. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000164580.39991.3d.

Laurent, Stephane, John Cockcroft, Luc Van Bortel, Pierre Boutouyrie, Cristina Giannattasio, Daniel Hayoz, Bruno Pannier, et al. 2006. "Expert Consensus Document on Arterial

Stiffness: Methodological Issues and Clinical Applications." *European Heart Journal* 27 (21): 2588–2605. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl254.

Lavi, Shahar, Rania Egbarya, Ronit Lavi, and Giris Jacob. 2003. "Role of Nitric Oxide in the Regulation of Cerebral Blood Flow in Humans: Chemoregulation Versus Mechanoregulation." *Circulation* 107 (14): 1901–5. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000057973.99140.5A.

Le Plénier, Servane, Arthur Goron, Athanassia Sotiropoulos, Eliane Archambault, Chantal Guihenneuc, Stéphane Walrand, Jérome Salles, et al. 2017. "Citrulline Directly Modulates Muscle Protein Synthesis via the PI3K/MAPK/4E-BP1 Pathway in a Malnourished State: Evidence from in Vivo, Ex Vivo, and in Vitro Studies." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 312 (1): E27–36. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00203.2016.

Le Roux-Mallouf, Thibault, Florence Vibert, Stéphane Doutreleau, and Samuel Verges. 2017. "Effect of Acute Nitrate and Citrulline Supplementation on Muscle Microvascular Response to Ischemia-Reperfusion in Healthy Humans." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 42 (9): 901–8. https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0081.

Lévénez, Morgan, S. Jayne Garland, Malgorzata Klass, and Jacques Duchateau. 2008. "Cortical and Spinal Modulation of Antagonist Coactivation during a Submaximal Fatiguing Contraction in Humans." *Journal of Neurophysiology* 99 (2): 554–63. https://doi.org/10.1152/jn.00963.2007.

Levenson, J., F. Pessana, J. Gariepy, R. Armentano, and A. Simon. 2001. "Gender Differences in Wall Shear-Mediated Brachial Artery Vasoconstriction and Vasodilation." *Journal of the American College of Cardiology* 38 (6): 1668–74.

Lewis, N. C. S., A. R. Bain, K. W. Wildfong, D. J. Green, and P. N. Ainslie. 2017. "Acute Hypoxaemia and Vascular Function in Healthy Humans." *Experimental Physiology* 102 (12): 1635–46. https://doi.org/10.1113/EP086532.

Li, Nianzhen, Jai-Yoon Sul, and Philip G. Haydon. 2003. "A Calcium-Induced Calcium Influx Factor, Nitric Oxide, Modulates the Refilling of Calcium Stores in Astrocytes." *Journal of Neuroscience* 23 (32): 10302–10. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-32-10302.2003.

Liu, Tsung-Han, Ching-Lin Wu, Chi-Wei Chiang, Yu-Wei Lo, Hung-Fu Tseng, and Chen-Kang Chang. 2009. "No Effect of Short-Term Arginine Supplementation on Nitric Oxide Production, Metabolism and Performance in Intermittent Exercise in Athletes." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (6): 462–68. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.005.

Lok, Josephine, Punkaj Gupta, Shuzhen Guo, Woo Jean Kim, Michael J. Whalen, Klaus van Leyen, and Eng H. Lo. 2007. "Cell-Cell Signaling in the Neurovascular Unit." *Neurochemical Research* 32 (12): 2032–45. https://doi.org/10.1007/s11064-007-9342-9.

Loon, A. J. van, A. A. Botterweck, R. A. Goldbohm, H. A. Brants, J. D. van Klaveren, and P. A. van den Brandt. 1998. "Intake of Nitrate and Nitrite and the Risk of Gastric Cancer: A Prospective Cohort Study." *British Journal of Cancer* 78 (1): 129–35.

Lundberg, J. O., E. Weitzberg, J. M. Lundberg, and K. Alving. 1994. "Intragastric Nitric Oxide Production in Humans: Measurements in Expelled Air." *Gut* 35 (11): 1543–46.

Lundberg, Jon O., Mattias Carlström, and Eddie Weitzberg. 2018. “Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease.” *Cell Metabolism* 28 (1): 9–22. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.007.

Lundberg, Jon O., and Mirco Govoni. 2004a. “Inorganic Nitrate Is a Possible Source for Systemic Generation of Nitric Oxide.” *Free Radical Biology & Medicine* 37 (3): 395–400. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027.

———. 2004b. “Inorganic Nitrate Is a Possible Source for Systemic Generation of Nitric Oxide.” *Free Radical Biology & Medicine* 37 (3): 395–400. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027.

Lundberg, Jon O., and Eddie Weitzberg. 2009. “NO Generation from Inorganic Nitrate and Nitrite: Role in Physiology, Nutrition and Therapeutics.” *Archives of Pharmacal Research* 32 (8): 1119–26. https://doi.org/10.1007/s12272-009-1803-z.

Lundberg, Jon O., Eddie Weitzberg, and Mark T. Gladwin. 2008. “The Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway in Physiology and Therapeutics.” *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (2): 156–67. https://doi.org/10.1038/nrd2466.

MacLeod, Kristin E., Sean F. Nugent, Susan I. Barr, Michael S. Koehle, Benjamin C. Sporer, and Martin J. MacInnis. 2015. “Acute Beetroot Juice Supplementation Does Not Improve Cycling Performance in Normoxia or Moderate Hypoxia.” *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 25 (4): 359–66. https://doi.org/10.1123/ijsnem.2014-0129.

Magness, R. R., and C. R. Rosenfeld. 1989. “Local and Systemic Estradiol-17 Beta: Effects on Uterine and Systemic Vasodilation.” *The American Journal of Physiology* 256 (4 Pt 1): E536-542. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.256.4.E536.

Mardimae, Alexandra, Dahlia Y. Balaban, Matthew A. Machina, Anne Battisti-Charbonney, Jay S. Han, Rita Katznelson, Leonid L. Minkovich, et al. 2012. “The Interaction of Carbon Dioxide and Hypoxia in the Control of Cerebral Blood Flow.” *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 464 (4): 345–51. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1148-1.

Marillier, Mathieu, Pierrick J. Arnal, Thibault Le Roux Mallouf, Thomas Rupp, Guillaume Y. Millet, and Samuel Verges. 2017. “Effects of High-Altitude Exposure on Supraspinal Fatigue and Corticospinal Excitability and Inhibition.” *European Journal of Applied Physiology* 117 (8): 1747–61. https://doi.org/10.1007/s00421-017-3669-y.

Mariotti, François, Klaus J. Petzke, Damien Bonnet, Isabelle Szezepanski, Cécile Bos, Jean-François Huneau, and Hélène Fouillet. 2013. “Kinetics of the Utilization of Dietary Arginine for Nitric Oxide and Urea Synthesis: Insight into the Arginine-Nitric Oxide Metabolic System in Humans.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 97 (5): 972–79. https://doi.org/10.3945/ajcn.112.048025.

Martin, Kristy, Romain Meeusen, Kevin G. Thompson, Richard Keegan, and Ben Rattray. 2018. “Mental Fatigue Impairs Endurance Performance: A Physiological Explanation.” *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, June. https://doi.org/10.1007/s40279-018-0946-9.

Martin, Kristy, Disa Smee, Kevin G. Thompson, and Ben Rattray. 2014. “No Improvement of Repeated-Sprint Performance with Dietary Nitrate.” *International Journal of Sports Physiology and Performance* 9 (5): 845–50. https://doi.org/10.1123/ijspp.2013-0384.

Martín, M. J., M. D. Jiménez, and V. Motilva. 2001. “New Issues about Nitric Oxide and Its Effects on the Gastrointestinal Tract.” *Current Pharmaceutical Design* 7 (10): 881–908.

Masschelein, Evi, Ruud Van Thienen, Xu Wang, Ann Van Schepdael, Martine Thomis, and Peter Hespel. 2012a. “Dietary Nitrate Improves Muscle but Not Cerebral Oxygenation Status during Exercise in Hypoxia.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 113 (5): 736–45. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01253.2011.

———. 2012b. “Dietary Nitrate Improves Muscle but Not Cerebral Oxygenation Status during Exercise in Hypoxia.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 113 (5): 736–45. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01253.2011.

Maxwell, Andrew J. 2002. “Mechanisms of Dysfunction of the Nitric Oxide Pathway in Vascular Diseases.” *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 6 (2): 101–24. https://doi.org/10.1006/niox.2001.0394.

McConell, Glenn K., Scott J. Bradley, Terry J. Stephens, Benedict J. Canny, Bronwyn A. Kingwell, and Robert S. Lee-Young. 2007. “Skeletal Muscle NNOS Mu Protein Content Is Increased by Exercise Training in Humans.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (2): R821-828. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00796.2006.

McDonnell, Michelle N., Yuri Orekhov, and Ulf Ziemann. 2006. “The Role of GABA(B) Receptors in Intracortical Inhibition in the Human Motor Cortex.” *Experimental Brain Research* 173 (1): 86–93. https://doi.org/10.1007/s00221-006-0365-2.

McDonough, Paul, Brad J. Behnke, Danielle J. Padilla, Timothy I. Musch, and David C. Poole. 2005. “Control of Microvascular Oxygen Pressures in Rat Muscles Comprised of Different Fibre Types.” *The Journal of Physiology* 563 (Pt 3): 903–13. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079533.

McEniery, Carmel M., Yasmin, Ian R. Hall, Ahmad Qasem, Ian B. Wilkinson, and John R. Cockcroft. 2005. “Normal Vascular Aging: Differential Effects on Wave Reflection and Aortic Pulse Wave Velocity: The Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT).” *Journal of the American College of Cardiology* 46 (9): 1753–60. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.07.037.

McKelvie, R. S., and N. L. Jones. 1989. “Cardiopulmonary Exercise Testing.” *Clinics in Chest Medicine* 10 (2): 277–91.

McLay, Kaitlin M., Josh P. Nederveen, Silvia Pogliaghi, Donald H. Paterson, and Juan M. Murias. 2016. “Repeatability of Vascular Responsiveness Measures Derived from Near-Infrared Spectroscopy.” *Physiological Reports* 4 (9). https://doi.org/10.14814/phy2.12772.

McMahon, Nicholas F., Michael D. Leveritt, and Toby G. Pavey. 2017. “The Effect of Dietary Nitrate Supplementation on Endurance Exercise Performance in Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 47 (4): 735–56. https://doi.org/10.1007/s40279-016-0617-7.

McMorris, T., and J. Graydon. 1996. “The Effect of Exercise on the Decision-Making Performance of Experienced and Inexperienced Soccer Players.” *Research Quarterly for Exercise and Sport* 67 (1): 109–14. https://doi.org/10.1080/02701367.1996.10607933.

Meirelles, Claudia M., and Cristiane Matsuura. 2018. “Acute Supplementation of L-Arginine Affects Neither Strength Performance nor Nitric Oxide Production.” *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 58 (3): 216–20. https://doi.org/10.23736/S0022-4707.16.06680-9.

Meirelles, Luisa R. de, Antônio C. Mendes-Ribeiro, Marcelle M. Santoro, Michely A. P. Mendes, Michele N. S. B. da Silva, Giovanni E. Mann, and Tatiana M. C. Brunini. 2007.

"Inhibitory Effects of Endogenous L-Arginine Analogues on Nitric Oxide Synthesis in Platelets: Role in Platelet Hyperaggregability in Hypertension." *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 34 (12): 1267–71. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04712.x.

Mensinga, Tjeert T., Gerrit J. Speijers, and Jan Meulenbelt. 2003. "Health Implications of Exposure to Environmental Nitrogenous Compounds." *Toxicological Reviews* 22 (1): 41–51.

Merry, Troy L., Gordon S. Lynch, and Glenn K. McConell. 2010. "Downstream Mechanisms of Nitric Oxide-Mediated Skeletal Muscle Glucose Uptake during Contraction." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (6): R1656-1665. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00433.2010.

Merton, P. A. 1954. "Voluntary Strength and Fatigue." *The Journal of Physiology* 123 (3): 553–64. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005070.

Milia, Raffaele, Silvana Roberto, Gabriele Mulliri, Andrea Loi, Maura Marcelli, Gianmarco Sainas, Nicola Milia, Elisabetta Marongiu, and Antonio Crisafulli. 2015. "Effect of Aging on Hemodynamic Response to Metaboreflex Activation." *European Journal of Applied Physiology* 115 (8): 1693–1703. https://doi.org/10.1007/s00421-015-3153-5.

Miller, Gary D., Anthony P. Marsh, Robin W. Dove, Daniel Beavers, Tennille Presley, Christine Helms, Erika Bechtold, S. Bruce King, and Daniel Kim-Shapiro. 2012. "Plasma Nitrate and Nitrite Are Increased by a High-Nitrate Supplement but Not by High-Nitrate Foods in Older Adults." *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 32 (3): 160–68. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.02.002.

Millet, Guillaume Y., Vincent Martin, Alain Martin, and Samuel Vergès. 2011. "Electrical Stimulation for Testing Neuromuscular Function: From Sport to Pathology." *European Journal of Applied Physiology* 111 (10): 2489–2500. https://doi.org/10.1007/s00421-011-1996-y.

Mirea, Oana, I. Donoiu, and I. E. Pleşea. 2012. "Arterial Aging: A Brief Review." *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie* 53 (3): 473–77.

Mirenayat, Mohammad Sadegh, Sajjad Moradi, Hamed Mohammadi, and Mohammad Hossein Rouhani. 2018. "Effect of L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials." *Current Hypertension Reports* 20 (11): 98. https://doi.org/10.1007/s11906-018-0898-3.

Mirmiran, Parvin, Zahra Bahadoran, Asghar Ghasemi, and Fereidoun Azizi. 2016. "The Association of Dietary L-Arginine Intake and Serum Nitric Oxide Metabolites in Adults: A Population-Based Study." *Nutrients* 8 (5). https://doi.org/10.3390/nu8050311.

Mitchell, Gary F. 2007. "Impedance Progress." *Hypertension*, June. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.087239.

Mitchell, Gary F., Helen Parise, Emelia J. Benjamin, Martin G. Larson, Michelle J. Keyes, Joseph A. Vita, Ramachandran S. Vasan, and Daniel Levy. 2004. "Changes in Arterial Stiffness and Wave Reflection With Advancing Age in Healthy Men and Women." *Hypertension*, June. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.0000128420.01881.aa.

Modin, A., H. Björne, M. Herulf, K. Alving, E. Weitzberg, and J. O. Lundberg. 2001. "Nitrite-Derived Nitric Oxide: A Possible Mediator of 'acidic-Metabolic' Vasodilation." *Acta*

Physiologica Scandinavica 171 (1): 9–16. https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2001.00771.x.

Moinard, C., J. Maccario, S. Walrand, V. Lasserre, J. Marc, Y. Boirie, and L. Cynober. 2016. "Arginine Behaviour after Arginine or Citrulline Administration in Older Subjects." *The British Journal of Nutrition* 115 (3): 399–404. https://doi.org/10.1017/S0007114515004638.

Moinard, C., I. Nicolis, N. Neveux, S. Darquy, S. Bénazeth, and L. Cynober. 2008. "Dose-Ranging Effects of Citrulline Administration on Plasma Amino Acids and Hormonal Patterns in Healthy Subjects: The Citrudose Pharmacokinetic Study." *The British Journal of Nutrition* 99 (4): 855–62. https://doi.org/10.1017/S0007114507841110.

MONCADA, S. 1991. "Nitric Oxide : Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology." *Pharmacol Rev* 43: 109–42.

Morris, Claudia R., Sidney M. Morris, Ward Hagar, Jane Van Warmerdam, Susan Claster, Diane Kepka-Lenhart, Lorenzo Machado, Frans A. Kuypers, and Elliott P. Vichinsky. 2003. "Arginine Therapy: A New Treatment for Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease?" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (1): 63–69. https://doi.org/10.1164/rccm.200208-967OC.

Morris, Sidney M. 2004. "Enzymes of Arginine Metabolism." *The Journal of Nutrition* 134 (10 Suppl): 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S. https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2743S.

Morton, R. Hugh. 2006. "The Critical Power and Related Whole-Body Bioenergetic Models." *European Journal of Applied Physiology* 96 (4): 339–54. https://doi.org/10.1007/s00421-005-0088-2.

Muggeridge, David J., Christopher C. F. Howe, Owen Spendiff, Charles Pedlar, Philip E. James, and Chris Easton. 2013. "The Effects of a Single Dose of Concentrated Beetroot Juice on Performance in Trained Flatwater Kayakers." *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 23 (5): 498–506.

Muggeridge, David J., Nicholas Sculthorpe, Philip E. James, and Chris Easton. 2017. "The Effects of Dietary Nitrate Supplementation on the Adaptations to Sprint Interval Training in Previously Untrained Males." *Journal of Science and Medicine in Sport* 20 (1): 92–97. https://doi.org/10.1016/j.jsams.2016.04.014.

Murray, Christopher J. L., Theo Vos, Rafael Lozano, Mohsen Naghavi, Abraham D. Flaxman, Catherine Michaud, Majid Ezzati, et al. 2012. "Disability-Adjusted Life Years (DALYs) for 291 Diseases and Injuries in 21 Regions, 1990-2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet (London, England)* 380 (9859): 2197–2223. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61689-4.

Murrell, Carissa J., James D. Cotter, Kate N. Thomas, Samuel J. E. Lucas, Michael J. A. Williams, and Philip N. Ainslie. 2013. "Cerebral Blood Flow and Cerebrovascular Reactivity at Rest and during Sub-Maximal Exercise: Effect of Age and 12-Week Exercise Training." *Age* 35 (3): 905–20. https://doi.org/10.1007/s11357-012-9414-x.

Napoli, Claudio, Filomena de Nigris, Sharon Williams-Ignarro, Orlando Pignalosa, Vincenzo Sica, and Louis J. Ignarro. 2006. "Nitric Oxide and Atherosclerosis: An Update." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 15 (4): 265–79. https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.03.011.

Newcomer, Sean C., Urs A. Leuenberger, Cynthia S. Hogeman, Brian D. Handly, and David N. Proctor. 2004. "Different Vasodilator Responses of Human Arms and Legs." *The*

Journal of Physiology 556 (Pt 3): 1001–11. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059717.

Nisoli, Enzo, Emilio Clementi, Clara Paolucci, Valeria Cozzi, Cristina Tonello, Clara Sciorati, Renata Bracale, et al. 2003. "Mitochondrial Biogenesis in Mammals: The Role of Endogenous Nitric Oxide." *Science (New York, N.Y.)* 299 (5608): 896–99. https://doi.org/10.1126/science.1079368.

Nohl, H., K. Staniek, B. Sobhian, S. Bahrami, H. Redl, and A. V. Kozlov. 2000. "Mitochondria Recycle Nitrite Back to the Bioregulator Nitric Monoxide." *Acta Biochimica Polonica* 47 (4): 913–21.

Nosarev, Alexei V., Lyudmila V. Smagliy, Yana Anfinogenova, Sergey V. Popov, and Leonid V. Kapilevich. 2015. "Exercise and NO Production: Relevance and Implications in the Cardiopulmonary System." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2 (January). https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00073.

Nyakayiru, Jean M., Kristin L. Jonvik, Philippe J. M. Pinckaers, Joan Senden, Luc J. C. van Loon, and Lex B. Verdijk. 2017. "No Effect of Acute and 6-Day Nitrate Supplementation on VO2 and Time-Trial Performance in Highly Trained Cyclists." *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 27 (1): 11–17. https://doi.org/10.1123/ijsnem.2016-0034.

Nybäck, Linn, Caroline Glännerud, Gustav Larsson, Eddie Weitzberg, Oliver Michael Shannon, and Kerry McGawley. 2017. "Physiological and Performance Effects of Nitrate Supplementation during Roller-Skiing in Normoxia and Normobaric Hypoxia." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 70 (November): 1–8. https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.08.001.

Ochiai, Masayuki, Toshio Hayashi, Masahiko Morita, Koichiro Ina, Morihiko Maeda, Fumiko Watanabe, and Koji Morishita. 2012a. "Short-Term Effects of L-Citrulline Supplementation on Arterial Stiffness in Middle-Aged Men." *International Journal of Cardiology* 155 (2): 257–61. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.10.004.

———. 2012b. "Short-Term Effects of L-Citrulline Supplementation on Arterial Stiffness in Middle-Aged Men." *International Journal of Cardiology* 155 (2): 257–61. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.10.004.

Omar, S. A., A. J. Webb, J. O. Lundberg, and E. Weitzberg. 2016. "Therapeutic Effects of Inorganic Nitrate and Nitrite in Cardiovascular and Metabolic Diseases." *Journal of Internal Medicine* 279 (4): 315–36. https://doi.org/10.1111/joim.12441.

Omar, Sami A., Esther Artime, and Andrew J. Webb. 2012. "A Comparison of Organic and Inorganic Nitrates/Nitrites." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 26 (4): 229–40. https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.008.

Orea-Tejeda, Arturo, Juan José Orozco-Gutiérrez, Lilia Castillo-Martínez, Candace Keirns-Davies, Patricia Montano-Hernández, Oscar Vázquez-Díaz, Adrián Valdespino-Trejo, Oscar Infante, and Raúl Martínez-Memije. 2010. "The Effect of L-Arginine and Citrulline on Endothelial Function in Patients in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction." *Cardiology Journal* 17 (5): 464–70.

Osowska, S., T. Duchemann, S. Walrand, A. Paillard, Y. Boirie, L. Cynober, and C. Moinard. 2006. "Citrulline Modulates Muscle Protein Metabolism in Old Malnourished Rats." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291 (3): E582-586. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00398.2005.

Paddon-Jones, Douglas, Elisabet Børsheim, and Robert R. Wolfe. 2004. "Potential Ergogenic Effects of Arginine and Creatine Supplementation." *The Journal of Nutrition* 134 (10 Suppl): 2888S-2894S; discussion 2895S.

Palmer, R. M., D. D. Rees, D. S. Ashton, and S. Moncada. 1988. "L-Arginine Is the Physiological Precursor for the Formation of Nitric Oxide in Endothelium-Dependent Relaxation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 153 (3): 1251–56.

Palmieri, Riann M., Christopher D. Ingersoll, and Mark A. Hoffman. 2004. "The Hoffmann Reflex: Methodologic Considerations and Applications for Use in Sports Medicine and Athletic Training Research." *Journal of Athletic Training* 39 (3): 268–77.

Park, Ji Won, Barbora Piknova, James Kurtz, Shalini Seetharaman, Stephen J. Wagner, and Alan N. Schechter. 2013. "Effect of Storage on Levels of Nitric Oxide Metabolites in Platelet Preparations." *Transfusion* 53 (3): 637–44. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03777.x.

Parker, Beth A., Samuel J. Ridout, and David N. Proctor. 2006. "Age and Flow-Mediated Dilation: A Comparison of Dilatory Responsiveness in the Brachial and Popliteal Arteries." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 291 (6): H3043–49. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00190.2006.

Patrician, Alexander, Harald Engan, David Lundsten, Ludger Grote, Helena Vigetun-Haughey, and Erika Schagatay. 2018. "The Effect of Dietary Nitrate on Nocturnal Sleep-Disordered Breathing and Arterial Oxygen Desaturation at High Altitude." *High Altitude Medicine & Biology* 19 (1): 21–27. https://doi.org/10.1089/ham.2017.0039.

Paulson, O. B., S. Strandgaard, and L. Edvinsson. 1990. "Cerebral Autoregulation." *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews* 2 (2): 161–92.

Peacock, Oliver, Arnt Erik Tjønna, Philip James, Ulrik Wisløff, Boye Welde, Nikolai Böhlke, Alan Smith, Keith Stokes, Christian Cook, and Oyvind Sandbakk. 2012. "Dietary Nitrate Does Not Enhance Running Performance in Elite Cross-Country Skiers." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 44 (11): 2213–19. https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182640f48.

Peebles, Karen, Leo Celi, Ken McGrattan, Carissa Murrell, Kate Thomas, and Philip N. Ainslie. 2007. "Human Cerebrovascular and Ventilatory CO2 Reactivity to End-Tidal, Arterial and Internal Jugular Vein PCO2." *The Journal of Physiology* 584 (Pt 1): 347–57. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.137075.

Peeling, Peter, Gregory R. Cox, Nicola Bullock, and Louise M. Burke. 2015. "Beetroot Juice Improves On-Water 500 M Time-Trial Performance, and Laboratory-Based Paddling Economy in National and International-Level Kayak Athletes." *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 25 (3): 278–84. https://doi.org/10.1123/ijsnem.2014-0110.

Pereira, Telmo, and João Maldonado. 2018. "Pulse Wave Analysis Reproducibility with the Complior Analyse Device: A Methodological Study." *Blood Pressure Monitoring* 23 (3): 164–70. https://doi.org/10.1097/MBP.0000000000000316.

Piknova, Barbora, Ara Kocharyan, Alan N. Schechter, and Afonso C. Silva. 2011. "The Role of Nitrite in Neurovascular Coupling." *Brain Research* 1407 (August): 62–68. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.045.

Polgar, J., M. A. Johnson, D. Weightman, and D. Appleton. 1973. "Data on Fibre Size in Thirty-Six Human Muscles. An Autopsy Study." *Journal of the Neurological Sciences* 19 (3): 307–18.

Porcelli, Simone, Lorenzo Pugliese, Enrico Rejc, Gaspare Pavei, Matteo Bonato, Michela Montorsi, Antonio La Torre, Letizia Rasica, and Mauro Marzorati. 2016a. "Effects of a Short-Term High-Nitrate Diet on Exercise Performance." *Nutrients* 8 (9). https://doi.org/10.3390/nu8090534.

———. 2016b. "Effects of a Short-Term High-Nitrate Diet on Exercise Performance." *Nutrients* 8 (9). https://doi.org/10.3390/nu8090534.

Porcelli, Simone, Matthew Ramaglia, Giuseppe Bellistri, Gaspare Pavei, Lorenzo Pugliese, Michela Montorsi, Letizia Rasica, and Mauro Marzorati. 2015. "Aerobic Fitness Affects the Exercise Performance Responses to Nitrate Supplementation." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 47 (8): 1643–51. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000577.

Preli, Robert B., Karen Potvin Klein, and David M. Herrington. 2002. "Vascular Effects of Dietary L-Arginine Supplementation." *Atherosclerosis* 162 (1): 1–15.

Presley, Tennille D., Ashley R. Morgan, Erika Bechtold, William Clodfelter, Robin W. Dove, Janine M. Jennings, Robert A. Kraft, et al. 2011. "Acute Effect of a High Nitrate Diet on Brain Perfusion in Older Adults." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 24 (1): 34–42. https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.10.002.

Qin, Lizheng, Xibao Liu, Qifei Sun, Zhipeng Fan, Dengsheng Xia, Gang Ding, Hwei Ling Ong, et al. 2012. "Sialin (SLC17A5) Functions as a Nitrate Transporter in the Plasma Membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (33): 13434–39. https://doi.org/10.1073/pnas.1116633109.

Rådegran, G., and B. Saltin. 1999. "Nitric Oxide in the Regulation of Vasomotor Tone in Human Skeletal Muscle." *The American Journal of Physiology* 276 (6 Pt 2): H1951-1960.

Rammos, Christos, Ulrike B. Hendgen-Cotta, Julia Sobierajski, Andrea Bernard, Malte Kelm, and Tienush Rassaf. 2014. "Dietary Nitrate Reverses Vascular Dysfunction in Older Adults with Moderately Increased Cardiovascular Risk." *Journal of the American College of Cardiology* 63 (15): 1584–85. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.08.691.

Rassier, D. E., and B. R. Macintosh. 2000. "Coexistence of Potentiation and Fatigue in Skeletal Muscle." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 33 (5): 499–508.

Richalet, Jean-Paul, Philippe Larmignat, Eric Poitrine, Murielle Letournel, and Florence Canouï-Poitrine. 2012. "Physiological Risk Factors for Severe High-Altitude Illness." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185 (2): 192–98. https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1396OC.

Richardson, G., S. L. Hicks, S. O'Byrne, M. T. Frost, K. Moore, N. Benjamin, and G. M. McKnight. 2002. "The Ingestion of Inorganic Nitrate Increases Gastric S-Nitrosothiol Levels and Inhibits Platelet Function in Humans." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 7 (1): 24–29.

Richardson, R. S., D. C. Poole, D. R. Knight, S. S. Kurdak, M. C. Hogan, B. Grassi, E. C. Johnson, K. F. Kendrick, B. K. Erickson, and P. D. Wagner. 1993. "High Muscle Blood Flow in Man: Is Maximal O2 Extraction Compromised?" *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 75 (4): 1911–16. https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.4.1911.

Roberts, Lee D., Tom Ashmore, Ben D. McNally, Steven A. Murfitt, Bernadette O. Fernandez, Martin Feelisch, Ross Lindsay, et al. 2017. "Inorganic Nitrate Mimics Exercise-

Stimulated Muscular Fiber-Type Switching and Myokine and γ-Aminobutyric Acid Release." *Diabetes* 66 (3): 674–88. https://doi.org/10.2337/db16-0843.

Rodriguez-Mateos, Ana, Michael Hezel, Hilal Aydin, Malte Kelm, Jon O. Lundberg, Eddie Weitzberg, Jeremy P. E. Spencer, and Christian Heiss. 2015. "Interactions between Cocoa Flavanols and Inorganic Nitrate: Additive Effects on Endothelial Function at Achievable Dietary Amounts." *Free Radical Biology and Medicine* 80 (March): 121–28. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.009.

Rossetti, Gabriella M. K., Jamie H. Macdonald, Lee J. Wylie, Samuel J. Little, Victoria Newton, Benjamin Wood, Kieran A. Hawkins, Rhys Beddoe, Hannah E. Davies, and Samuel J. Oliver. 2017. "Dietary Nitrate Supplementation Increases Acute Mountain Sickness Severity and Sense of Effort during Hypoxic Exercise." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 123 (4): 983–92. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00293.2017.

Rupp, Thomas, Thibault Le Roux Mallouf, Stéphane Perrey, Bernard Wuyam, Guillaume Y. Millet, and Samuel Verges. 2015. "CO2 Clamping, Peripheral and Central Fatigue during Hypoxic Knee Extensions in Men." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 47 (12): 2513–24. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000724.

Sardeli, Amanda V., Arthur F. Gáspari, and Mara P. Chacon-Mikahil. 2018. "Acute, Short-, and Long-Term Effects of Different Types of Exercise in Central Arterial Stiffness: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 58 (6): 923–32. https://doi.org/10.23736/S0022-4707.17.07486-2.

Scaglioni, G, M V Narici, N A Maffiuletti, M Pensini, and A Martin. 2003. "Effect of Ageing on the Electrical and Mechanical Properties of Human Soleus Motor Units Activated by the H Reflex and M Wave." *The Journal of Physiology* 548 (Pt 2): 649–61. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.032763.

Schrage, William G., Michael J. Joyner, and Frank A. Dinenno. 2004. "Local Inhibition of Nitric Oxide and Prostaglandins Independently Reduces Forearm Exercise Hyperaemia in Humans." *The Journal of Physiology* 557 (Pt 2): 599–611. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.061283.

Schwartz, M. A., and C. Lechene. 1992. "Adhesion Is Required for Protein Kinase C-Dependent Activation of the Na+/H+ Antiporter by Platelet-Derived Growth Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (13): 6138–41.

Schwedhelm, Edzard, Renke Maas, Ralf Freese, Donald Jung, Zoltan Lukacs, Alen Jambrecina, William Spickler, Friedrich Schulze, and Rainer H. Böger. 2008a. "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Oral L-Citrulline and L-Arginine: Impact on Nitric Oxide Metabolism." *British Journal of Clinical Pharmacology* 65 (1): 51–59. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x.

———. 2008b. "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Oral L-Citrulline and L-Arginine: Impact on Nitric Oxide Metabolism." *British Journal of Clinical Pharmacology* 65 (1): 51–59. https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02990.x.

Sehgel, Nancy L., Stephen F. Vatner, and Gerald A. Meininger. 2015. "'Smooth Muscle Cell Stiffness Syndrome'—Revisiting the Structural Basis of Arterial Stiffness." *Frontiers in Physiology* 6 (November). https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00335.

Shannon, Oliver M., Lauren Duckworth, Matthew J. Barlow, Kevin Deighton, Jamie Matu, Emily L. Williams, David Woods, et al. 2017. "Effects of Dietary Nitrate Supplementation on Physiological Responses, Cognitive Function, and Exercise

Performance at Moderate and Very-High Simulated Altitude." *Frontiers in Physiology* 8: 401. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00401.

Shen, W., R. Tian, K. W. Saupe, M. Spindler, and J. S. Ingwall. 2001. "Endogenous Nitric Oxide Enhances Coupling between O2 Consumption and ATP Synthesis in Guinea Pig Hearts." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 281 (2): H838-846. https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.2.H838.

Shepherd, Anthony I., Mark Gilchrist, Paul G. Winyard, Andrew M. Jones, Ewelina Hallmann, Renata Kazimierczak, Ewa Rembialkowska, Nigel Benjamin, Angela C. Shore, and Daryl P. Wilkerson. 2015. "Effects of Dietary Nitrate Supplementation on the Oxygen Cost of Exercise and Walking Performance in Individuals with Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Crossover Trial." *Free Radical Biology & Medicine* 86 (September): 200–208. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.014.

Shepherd, Anthony I., Daryl P. Wilkerson, Lee Dobson, James Kelly, Paul G. Winyard, Andrew M. Jones, Nigel Benjamin, Angela C. Shore, and Mark Gilchrist. 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: Biology and Chemistry* 48 (August): 31–37. https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.01.002.

Shiva, Sruti, Zhi Huang, Rozalina Grubina, Junhui Sun, Lorna A. Ringwood, Peter H. MacArthur, Xiuli Xu, Elizabeth Murphy, Victor M. Darley-Usmar, and Mark T. Gladwin. 2007. "Deoxymyoglobin Is a Nitrite Reductase That Generates Nitric Oxide and Regulates Mitochondrial Respiration." *Circulation Research* 100 (5): 654–61. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b.

Sidhu, Simranjit K., David J. Bentley, and Timothy J. Carroll. 2009. "Cortical Voluntary Activation of the Human Knee Extensors Can Be Reliably Estimated Using Transcranial Magnetic Stimulation." *Muscle & Nerve* 39 (2): 186–96. https://doi.org/10.1002/mus.21064.

Siervo, Mario, Jose Lara, Ikponmwonsa Ogbonmwan, and John C. Mathers. 2013a. "Inorganic Nitrate and Beetroot Juice Supplementation Reduces Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Journal of Nutrition* 143 (6): 818–26. https://doi.org/10.3945/jn.112.170233.

———. 2013b. "Inorganic Nitrate and Beetroot Juice Supplementation Reduces Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Journal of Nutrition* 143 (6): 818–26. https://doi.org/10.3945/jn.112.170233.

Siervo, Mario, Clio Oggioni, Djordje G. Jakovljevic, Michael Trenell, John C. Mathers, David Houghton, Carlos Celis-Morales, et al. 2016. "Dietary Nitrate Does Not Affect Physical Activity or Outcomes in Healthy Older Adults in a Randomized, Cross-over Trial." *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 36 (12): 1361–69. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.11.004.

Sindler, Amy L., Bradley S. Fleenor, John W. Calvert, Kurt D. Marshall, Melanie L. Zigler, David J. Lefer, and Douglas R. Seals. 2011. "Nitrite Supplementation Reverses Vascular Endothelial Dysfunction and Large Elastic Artery Stiffness with Aging." *Aging Cell* 10 (3): 429–37. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00679.x.

Smith, Lori W., John D. Smith, and David S. Criswell. 2002. "Involvement of Nitric Oxide Synthase in Skeletal Muscle Adaptation to Chronic Overload." *Journal of Applied*

Physiology (Bethesda, Md.: 1985) 92 (5): 2005–11. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00950.2001.

Stamler, J. S., and G. Meissner. 2001. "Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle." *Physiological Reviews* 81 (1): 209–37. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.209.

Stanaway, Luke, Kay Rutherfurd-Markwick, Rachel Page, and Ajmol Ali. 2017. "Performance and Health Benefits of Dietary Nitrate Supplementation in Older Adults: A Systematic Review." *Nutrients* 9 (11). https://doi.org/10.3390/nu9111171.

Steinberg, H. O., and A. D. Baron. 2002. "Vascular Function, Insulin Resistance and Fatty Acids." *Diabetologia* 45 (5): 623–34. https://doi.org/10.1007/s00125-002-0800-2.

Stratton, J. R., W. C. Levy, M. D. Cerqueira, R. S. Schwartz, and I. B. Abrass. 1994. "Cardiovascular Responses to Exercise. Effects of Aging and Exercise Training in Healthy Men." *Circulation*, April. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.89.4.1648.

Sunderland, Kyle L., Felicia Greer, and Jacobo Morales. 2011. "VO2max and Ventilatory Threshold of Trained Cyclists Are Not Affected by 28-Day L-Arginine Supplementation." *Journal of Strength and Conditioning Research* 25 (3): 833–37. https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181c6a14d.

Sureda, Antoni, and Antoni Pons. 2012. "Arginine and Citrulline Supplementation in Sports and Exercise: Ergogenic Nutrients?" *Medicine and Sport Science* 59: 18–28. https://doi.org/10.1159/000341937.

Suzuki, Takashi, Masahiko Morita, Yoshinori Kobayashi, and Ayako Kamimura. 2016. "Oral L-Citrulline Supplementation Enhances Cycling Time Trial Performance in Healthy Trained Men: Double-Blind Randomized Placebo-Controlled 2-Way Crossover Study." *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 13: 6. https://doi.org/10.1186/s12970-016-0117-z.

Taddei, Stefano, Agostino Virdis, Lorenzo Ghiadoni, Guido Salvetti, Giampaolo Bernini, Armando Magagna, and Antonio Salvetti. 2001. "Age-Related Reduction of NO Availability and Oxidative Stress in Humans." *Hypertension*, August. https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.38.2.274.

Takeda, Kohei, Masanao Machida, Akiko Kohara, Naomi Omi, and Tohru Takemasa. 2011. "Effects of Citrulline Supplementation on Fatigue and Exercise Performance in Mice." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 57 (3): 246–50.

Takuwa, Hiroyuki, Tetsuya Matsuura, Rumiana Bakalova, Takayuki Obata, and Iwao Kanno. 2010. "Contribution of Nitric Oxide to Cerebral Blood Flow Regulation under Hypoxia in Rats." *The Journal of Physiological Sciences: JPS* 60 (6): 399–406. https://doi.org/10.1007/s12576-010-0108-9.

Tang, Jason E., Paul J. Lysecki, Joshua J. Manolakos, Maureen J. MacDonald, Mark A. Tarnopolsky, and Stuart M. Phillips. 2011. "Bolus Arginine Supplementation Affects Neither Muscle Blood Flow nor Muscle Protein Synthesis in Young Men at Rest or after Resistance Exercise." *The Journal of Nutrition* 141 (2): 195–200. https://doi.org/10.3945/jn.110.130138.

Tangphao, Oranee, Stephan Chalon, Heitor Moreno, Brian B. Hoffman, and Terrence F. Blaschke. 1999. "Pharmacokinetics of L-Arginine during Chronic Administration to Patients with Hypercholesterolaemia." *Clinical Science* 96 (2): 199–207. https://doi.org/10.1042/cs0960199.

Temesi, John, Mathieu Gruet, Thomas Rupp, Samuel Verges, and Guillaume Y. Millet. 2014. "Resting and Active Motor Thresholds versus Stimulus-Response Curves to Determine Transcranial Magnetic Stimulation Intensity in Quadriceps Femoris." *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation* 11 (March): 40. https://doi.org/10.1186/1743-0003-11-40.

Tesch, P. A., and J. Karlsson. 1985. "Muscle Fiber Types and Size in Trained and Untrained Muscles of Elite Athletes." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 59 (6): 1716–20. https://doi.org/10.1152/jappl.1985.59.6.1716.

Thompson, Christopher, Anni Vanhatalo, Harry Jell, Jonathan Fulford, James Carter, Lara Nyman, Stephen J. Bailey, and Andrew M. Jones. 2016. "Dietary Nitrate Supplementation Improves Sprint and High-Intensity Intermittent Running Performance." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 61: 55–61. https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.10.006.

Thompson, Christopher, Lee J. Wylie, Jamie R. Blackwell, Jonathan Fulford, Matthew I. Black, James Kelly, Sinead T. J. McDonagh, et al. 2017. "Influence of Dietary Nitrate Supplementation on Physiological and Muscle Metabolic Adaptations to Sprint Interval Training." *Journal of Applied Physiology* 122 (3): 642–52. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00909.2016.

Thompson, Christopher, Lee J. Wylie, Jonathan Fulford, James Kelly, Matthew I. Black, Sinead T. J. McDonagh, Asker E. Jeukendrup, Anni Vanhatalo, and Andrew M. Jones. 2015. "Dietary Nitrate Improves Sprint Performance and Cognitive Function during Prolonged Intermittent Exercise." *European Journal of Applied Physiology* 115 (9): 1825–34. https://doi.org/10.1007/s00421-015-3166-0.

Tinken, Toni M., Dick H. J. Thijssen, Mark A. Black, N. Timothy Cable, and Daniel J. Green. 2008. "Time Course of Change in Vasodilator Function and Capacity in Response to Exercise Training in Humans." *The Journal of Physiology* 586 (20): 5003–12. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.158014.

Todd, Gabrielle, Janet L. Taylor, and S. C. Gandevia. 2003. "Measurement of Voluntary Activation of Fresh and Fatigued Human Muscles Using Transcranial Magnetic Stimulation." *The Journal of Physiology* 551 (Pt 2): 661–71. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.044099.

Totzeck, Matthias, Ulrike B. Hendgen-Cotta, Christos Rammos, Lisa-Marie Frommke, Christian Knackstedt, Hans-Georg Predel, Malte Kelm, and Tienush Rassaf. 2012. "Higher Endogenous Nitrite Levels Are Associated with Superior Exercise Capacity in Highly Trained Athletes." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 27 (2): 75–81. https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.05.003.

Tousoulis, Dimitris, Anna-Maria Kampoli, Costas Tentolouris, Nikolaos Papageorgiou, and Christodoulos Stefanadis. 2012. "The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function." *Current Vascular Pharmacology* 10 (1): 4–18.

Tzima, Eleni, Mohamed Irani-Tehrani, William B. Kiosses, Elizabetta Dejana, David A. Schultz, Britta Engelhardt, Gaoyuan Cao, Horace DeLisser, and Martin Alexander Schwartz. 2005. "A Mechanosensory Complex That Mediates the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress." *Nature* 437 (7057): 426–31. https://doi.org/10.1038/nature03952.

Van Beekvelt, M. C., W. N. Colier, R. A. Wevers, and B. G. Van Engelen. 2001. "Performance of Near-Infrared Spectroscopy in Measuring Local O(2) Consumption and Blood Flow

in Skeletal Muscle." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 90 (2): 511–19.

Van Bortel, Luc M., Stephane Laurent, Pierre Boutouyrie, Phil Chowienczyk, J. K. Cruickshank, Tine De Backer, Jan Filipovsky, et al. 2012. "Expert Consensus Document on the Measurement of Aortic Stiffness in Daily Practice Using Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity." *Journal of Hypertension* 30 (3): 445–48. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32834fa8b0.

Van der Avoort, Cindy M. T., Luc J. C. Van Loon, Maria T. E. Hopman, and Lex B. Verdijk. 2018. "Increasing Vegetable Intake to Obtain the Health Promoting and Ergogenic Effects of Dietary Nitrate." *European Journal of Clinical Nutrition* 72 (11): 1485–89. https://doi.org/10.1038/s41430-018-0140-z.

Van Mil, Annette H. M., Aart Spilt, Mark A. Van Buchem, Edward L. E. M. Bollen, Luc Teppema, Rudi G. J. Westendorp, and Gerard J. Blauw. 2002. "Nitric Oxide Mediates Hypoxia-Induced Cerebral Vasodilation in Humans." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 92 (3): 962–66. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00616.2001.

Vanhatalo, Anni, Stephen J. Bailey, Jamie R. Blackwell, Fred J. DiMenna, Toby G. Pavey, Daryl P. Wilkerson, Nigel Benjamin, Paul G. Winyard, and Andrew M. Jones. 2010. "Acute and Chronic Effects of Dietary Nitrate Supplementation on Blood Pressure and the Physiological Responses to Moderate-Intensity and Incremental Exercise." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (4): R1121-1131. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00206.2010.

Vanhatalo, Anni, Stephen J. Bailey, Fred J. DiMenna, Jamie R. Blackwell, Gareth A. Wallis, and Andrew M. Jones. 2013. "No Effect of Acute L-Arginine Supplementation on O_2 Cost or Exercise Tolerance." *European Journal of Applied Physiology* 113 (7): 1805–19. https://doi.org/10.1007/s00421-013-2593-z.

Vanhatalo, Anni, Jonathan Fulford, Stephen J. Bailey, James R. Blackwell, Paul G. Winyard, and Andrew M. Jones. 2011. "Dietary Nitrate Reduces Muscle Metabolic Perturbation and Improves Exercise Tolerance in Hypoxia." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 22): 5517–28. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.216341.

Vanhatalo, Anni, Andrew M. Jones, James R. Blackwell, Paul G. Winyard, and Jonathan Fulford. 2014. "Dietary Nitrate Accelerates Postexercise Muscle Metabolic Recovery and O2 Delivery in Hypoxia." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 117 (12): 1460–70. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00096.2014.

Velmurugan, Shanti, Jasmine Ming Gan, Krishnaraj S. Rathod, Rayomand S. Khambata, Suborno M. Ghosh, Amy Hartley, Sven Van Eijl, et al. 2016. "Dietary Nitrate Improves Vascular Function in Patients with Hypercholesterolemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study." *The American Journal of Clinical Nutrition* 103 (1): 25–38. https://doi.org/10.3945/ajcn.115.116244.

Velzen, Agnes G. van, Adrienne J. A. M. Sips, Ronald C. Schothorst, Annette C. Lambers, and Jan Meulenbelt. 2008. "The Oral Bioavailability of Nitrate from Nitrate-Rich Vegetables in Humans." *Toxicology Letters* 181 (3): 177–81. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.07.019.

Versari, Daniele, Elena Daghini, Agostino Virdis, Lorenzo Ghiadoni, and Stefano Taddei. 2009. "Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease." *Diabetes Care* 32 Suppl 2 (November): S314-321. https://doi.org/10.2337/dc09-S330.

Viner, R. I., T. D. Williams, and C. Schöneich. 2000. “Nitric Oxide-Dependent Modification of the Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase: Localization of Cysteine Target Sites.” *Free Radical Biology & Medicine* 29 (6): 489–96.

Vlachopoulos, Charalambos, Konstantinos Aznaouridis, and Christodoulos Stefanadis. 2010. “Prediction of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality with Arterial Stiffness: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Journal of the American College of Cardiology* 55 (13): 1318–27. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.10.061.

Vøllestad, N. K. 1997. “Measurement of Human Muscle Fatigue.” *Journal of Neuroscience Methods* 74 (2): 219–27.

Wagner, D. A., D. S. Schultz, W. M. Deen, V. R. Young, and S. R. Tannenbaum. 1983. “Metabolic Fate of an Oral Dose of 15N-Labeled Nitrate in Humans: Effect of Diet Supplementation with Ascorbic Acid.” *Cancer Research* 43 (4): 1921–25.

Wahl, M., C. Görlach, T. Hortobágyi, and Z. Benyó. 1999. “Effects of Bradykinin in the Cerebral Circulation.” *Acta Physiologica Hungarica* 86 (2): 155–60.

Wang, Jialiang, Yi Deng, Xue Zou, Hao Luo, Pedro A. Jose, Chunjiang Fu, Jian Yang, and Chunyu Zeng. 2018. “Long-Term Low Salt Diet Increases Blood Pressure by Activation of the Renin-Angiotensin and Sympathetic Nervous Systems.” *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)*, November, 1–8. https://doi.org/10.1080/10641963.2018.1545850.

Waugh, W. H., C. W. Daeschner, B. A. Files, M. E. McConnell, and S. E. Strandjord. 2001. “Oral Citrulline as Arginine Precursor May Be Beneficial in Sickle Cell Disease: Early Phase Two Results.” *Journal of the National Medical Association* 93 (10): 363–71.

Webb, Andrew, Richard Bond, Peter McLean, Rakesh Uppal, Nigel Benjamin, and Amrita Ahluwalia. 2004. “Reduction of Nitrite to Nitric Oxide during Ischemia Protects against Myocardial Ischemia–Reperfusion Damage.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (37): 13683–88. https://doi.org/10.1073/pnas.0402927101.

Webb, Andrew J., Alexandra B. Milsom, Krishnaraj S. Rathod, Wai Lum Chu, Shehla Qureshi, Matthew J. Lovell, Florence M. J. Lecomte, et al. 2008. “Mechanisms Underlying Erythrocyte and Endothelial Nitrite Reduction to Nitric Oxide in Hypoxia: Role for Xanthine Oxidoreductase and Endothelial Nitric Oxide Synthase.” *Circulation Research* 103 (9): 957–64. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.175810.

Webb, Andrew J., Nakul Patel, Stavros Loukogeorgakis, Mike Okorie, Zainab Aboud, Shivani Misra, Rahim Rashid, et al. 2008a. “Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 51 (3): 784–90. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523.

———. 2008b. “Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 51 (3): 784–90. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523.

Wells, Brian J., Arch G. Mainous, and Charles J. Everett. 2005. “Association between Dietary Arginine and C-Reactive Protein.” *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 21 (2): 125–30. https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.03.021.

White, R. P., P. Vallance, and H. S. Markus. 2000. “Effect of Inhibition of Nitric Oxide Synthase on Dynamic Cerebral Autoregulation in Humans.” *Clinical Science (London, England: 1979)* 99 (6): 555–60.

Whitfield, J., A. Ludzki, G. J. F. Heigenhauser, J. M. G. Senden, L. B. Verdijk, L. J. C. van Loon, L. L. Spriet, and G. P. Holloway. 2016. "Beetroot Juice Supplementation Reduces Whole Body Oxygen Consumption but Does Not Improve Indices of Mitochondrial Efficiency in Human Skeletal Muscle." *The Journal of Physiology* 594 (2): 421–35. https://doi.org/10.1113/JP270844.

Wijnands, Karolina A. P., Hans Vink, Jacob J. Briedé, Ernst E. van Faassen, Wouter H. Lamers, Wim A. Buurman, and Martijn Poeze. 2012. "Citrulline a More Suitable Substrate than Arginine to Restore NO Production and the Microcirculation during Endotoxemia." *PloS One* 7 (5): e37439. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037439.

Williams, P. T. 2001. "Physical Fitness and Activity as Separate Heart Disease Risk Factors: A Meta-Analysis." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 33 (5): 754–61.

Windmueller, H. G., and A. E. Spaeth. 1981. "Source and Fate of Circulating Citrulline." *The American Journal of Physiology* 241 (6): E473-480. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1981.241.6.E473.

Woessner, Mary N., Luke C. McIlvenna, Joaquin Ortiz de Zevallos, Christopher J. Neil, and Jason D. Allen. 2018. "Dietary Nitrate Supplementation in Cardiovascular Health: An Ergogenic Aid or Exercise Therapeutic?" *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 314 (2): H195–212. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00414.2017.

Wray, D. Walter, Melissa A. H. Witman, Stephen J. Ives, John McDaniel, Anette S. Fjeldstad, Joel D. Trinity, Jamie D. Conklin, Mark A. Supiano, and Russell S. Richardson. 2011. "Progressive Handgrip Exercise: Evidence of Nitric Oxide-Dependent Vasodilation and Blood Flow Regulation in Humans." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300 (3): H1101-1107. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01115.2010.

Wu, G., and S. M. Morris. 1998. "Arginine Metabolism: Nitric Oxide and Beyond." *The Biochemical Journal* 336 (Pt 1) (November): 1–17.

Wu, Guoyao, Fuller W. Bazer, Teresa A. Davis, Sung Woo Kim, Peng Li, J. Marc Rhoads, M. Carey Satterfield, Stephen B. Smith, Thomas E. Spencer, and Yulong Yin. 2009. "Arginine Metabolism and Nutrition in Growth, Health and Disease." *Amino Acids* 37 (1): 153–68. https://doi.org/10.1007/s00726-008-0210-y.

Wylie, Lee J., Stephen J. Bailey, James Kelly, James R. Blackwell, Anni Vanhatalo, and Andrew M. Jones. 2016. "Influence of Beetroot Juice Supplementation on Intermittent Exercise Performance." *European Journal of Applied Physiology* 116 (2): 415–25. https://doi.org/10.1007/s00421-015-3296-4.

Wylie, Lee J., James Kelly, Stephen J. Bailey, Jamie R. Blackwell, Philip F. Skiba, Paul G. Winyard, Asker E. Jeukendrup, Anni Vanhatalo, and Andrew M. Jones. 2013. "Beetroot Juice and Exercise: Pharmacodynamic and Dose-Response Relationships." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 115 (3): 325–36. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00372.2013.

Wylie, Lee J., Joaquin Ortiz de Zevallos, Taro Isidore, Lara Nyman, Anni Vanhatalo, Stephen J. Bailey, and Andrew M. Jones. 2016. "Dose-Dependent Effects of Dietary Nitrate on the Oxygen Cost of Moderate-Intensity Exercise: Acute vs. Chronic Supplementation." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 57: 30–39. https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.04.004.

Ysart, G., P. Miller, G. Barrett, D. Farrington, P. Lawrance, and N. Harrison. 1999. "Dietary Exposures to Nitrate in the UK." *Food Additives and Contaminants* 16 (12): 521–32. https://doi.org/10.1080/026520399283669.

Zago, Anderson Saranz, Joon-Young Park, Nicola Fenty-Stewart, Leonardo Reis Silveira, Eduardo Kokubun, and Michael D. Brown. 2010. "Effects of Aerobic Exercise on the Blood Pressure, Oxidative Stress and ENOS Gene Polymorphism in Pre-Hypertensive Older People." *European Journal of Applied Physiology* 110 (4): 825–32. https://doi.org/10.1007/s00421-010-1568-6.

Zajac, Adam, Stanisław Poprzecki, Aleksandra Zebrowska, Małgorzata Chalimoniuk, and Jozef Langfort. 2010. "Arginine and Ornithine Supplementation Increases Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-1 Serum Levels after Heavy-Resistance Exercise in Strength-Trained Athletes." *Journal of Strength and Conditioning Research* 24 (4): 1082–90. https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d321ff.

Zhao, Yingzi, Paul M. Vanhoutte, and Susan W. S. Leung. 2015. "Vascular Nitric Oxide: Beyond ENOS." *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (2): 83–94. https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002.

Zimmermann, C., and R. L. Haberl. 2003. "L-Arginine Improves Diminished Cerebral CO2 Reactivity in Patients." *Stroke* 34 (3): 643–47. https://doi.org/10.1161/01.STR.0000056526.35630.47.

Zweier, J. L., P. Wang, A. Samouilov, and P. Kuppusamy. 1995. "Enzyme-Independent Formation of Nitric Oxide in Biological Tissues." *Nature Medicine* 1 (8): 804–9.

ANNEXE

Annexe 1 _ Plaquette de développement produit.

Annexe 2 _ Document listant les consignes à respecter pour les participants aux différentes études

Annexe 3 _ Questionnaire et relevé des repas et activités les deux jours précédant les sessions d'évaluations

Annexe 4 _ Données détaillées du nombre de contraction lors du test d'effort incrémental d'extension du quadriceps utilisé dans la ***publication 2***

Annexe 5 _ Programme d'entrainement utilisé dans la ***publication 4***

Annexe 6 _ Tableau indiquant les intensités de travail pour chaque participant

Annexe 7 _ Tableau de suivi des entrainements pour chaque participant

Annexe 8 _ Flow chart de la L-citrulline utilisé dans les compléments alimentaires

Annexe 1_ Plaquette de développement produit.

FitnessBoutique

Nous sommes distributeur de matériels de sport, de fitness et de musculation, mais surtout de produits de nutrition sportive et quotidienne. Que ce soit sur des denrées alimentaires ou des compléments alimentaires, en plus de distribuer des marques tierces, nous formulons et développons nos propres marques et produits de nutrition. Nous travaillons donc en collaboration avec des fournisseurs et des façonniers pour la majorité Français, et distribuons dans différents pays d'Europe en fonction de la règlementation en vigueur. Aujourd'hui notre réseau compte 82 magasins en France et à l'étranger (Belgique, Maroc…) dont 43 en Franchise, ainsi que des sites internet commerciaux là aussi en France et à l'étranger.

Laboratoire HP2

Pour ma part je fais partie de Fitnessboutique mais j'effectue mes travaux de recherche au sein du laboratoire HP2 INSERM, qui se situe dans l'hôpital Sud de Grenoble dans le service de médecine du sport. La thématique de recherche tourne autour d'une même entité clinique, l'hypoxie. Dans cette thématique j'explore la physiologie vasculaire et travaille sur le métabolisme du monoxyde d'azote (NO), m'amenant sur un complément alimentaire à base de nitrate qui est une source potentielle de NO.

Objectif

L'objectif est d'élaborer un produit fini composé d'extraits naturels enrichis en ion nitrate NO_3^- et en acide-aminés L-citrulline. L'ion Nitrate est connu depuis plus de 20 ans pour son comportement biochimique au sein de l'organisme et sa capacité à générer du NO au niveau systémique. Après ingestion, cet ion nitrate est réduit en ion nitrite au sein de l'estomac et de la circulation sanguine, qui lui-même pourra être réduit en NO. Ce NO circulant pourra alors jouer différents rôles physiologiquement importants, et notamment un rôle vasodilatateur. La L-citrulline fait également l'objet de nombreuses recherches depuis plusieurs années, là aussi en lien avec le NO. En plus de son rôle dans le métabolisme musculaire, la L-citrulline rentre dans le cycle arginine-citrulline-ornithine qui sert de source de substrats à l'enzyme NO synthase

qui produit du NO au niveau vasculaire. Plusieurs études ont montré une augmentation de production de NO après une supplémentation en L-citrulline.

Les essais cliniques vont permettre de tester l'effet d'un complément alimentaire composé de nitrate et de citrulline sur l'organisme, autant sur une thématique santé avec une évaluation de la santé cardiovasculaire, que sur une thématique exercice-physique avec une évaluation de la performance.

Les travaux de recherche ont commencé depuis Janvier 2015, avec l'évaluation de l'effet du complément en prise aigüe. Les résultats sont encourageants mais le produit testé doit être amélioré pour les évaluations sur la prise chronique du complément, avec une supplémentation quotidienne.

Le produit actuel

Nous travaillons aujourd'hui avec un extrait sec de betterave (NATUREX) qui est annoncé à 6500 ppm et dosé en général à 12000 ppm. A ceci sont rajoutés 6g de L-citrulline provenant du groupe CITRAGE. La L-citrulline est produite à partir du glucose (figure 1).

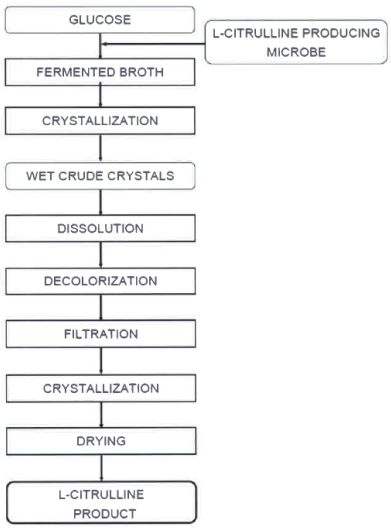


Figure 1. Flow chart de la L-citrulline produite par Citrage

Ceci fait donc environ 40g de poudre à mélanger dans 150 ml d'eau. La dissolution est longue (>20 minutes). Le produit sous sa forme aqueuse est totalement opaque et montre une couleur rouge très foncée. Le problème principal demeure dans le goût du produit, qui est difficilement ingérable sans dilution dans une quantité d'eau

considérable (> 400 ml). Les différents essais aromatiques n'ont rien donné, le goût de la betterave étant toujours très prononcé.

Solution

Extrait : augmenter la concentration en nitrate de l'extrait sec utilisé. Ceci rendrait possible l'aromatisation ou limiterait la dose de poudre afin de limiter la quantité ingérée ou d'augmenter la dilution.

Forme : boissons, gel, poudre à diluer, barre, pâte.

L'extrait de salade

Après essai et dosage vous nous proposez un extrait sec de salade qui présente une concentration en nitrate à priori 40x supérieure à l'extrait actuellement utilisé.

Informations techniques à détailler.

Cette matière pourrait être rajoutée à l'extrait sec de betterave afin d'augmenter la dose de nitrate. Le goût pourrait lui aussi être amélioré de par la potentielle neutralité de l'extrait sec de salade comparé au goût prononcé de l'extrait de betterave.

Cet extrait peut aussi être utilisé seul dans une autre matière sèche aromatisante. Le placebo utilisé actuellement se présente sous forme de poudre de cerise. Le nouveau complément pourrait être cette poudre de cerise en tant que support des 6g de citrulline et de l'extrait de salade.

Limites règlementaires

En fonction de l'extrait et de la nature du processus utilisé, et au regard de la règlementation française sur les compléments alimentaires, il se peut que nous rencontrions des difficultés pour obtenir l'autorisation de mise sur le marché français.

Il est donc primordial d'anticiper ces questions à partir de la fiche technique de l'extrait en question.

Développement

Les quantités d'extrait à produire peuvent s'évaluer en se basant sur deux phases. Une phase rapide qui correspond à la phase de recherche clinique, et une phase plus longue de développement du produit fini pour commercialisation.

- Développement recherche clinique (2 mois).

La phase de recherche clinique en prise chronique nécessite le développement de 2100 produits finis prêts à être ingérés. Ceci ne nécessite aucune démarche sur le plan règlementaire, et aucune démarche sur le plan marketing.

- Développement commercial (6-12 mois).

  Ce produit pourrait rentrer dans différentes gammes : produit santé, pré-workout en musculation, ou endurance… Sous forme de monodoses individuelles, il pourrait représenter un taux de défilement entre 6000 et 8000 doses à l'année dans l'ensemble du réseau. Il pourrait aussi prendre une forme de pot de poudre avec un nombre de doses défini (30 à 60) et pourrait représenter 2500 à 3000 pots à l'année.

Produits actuellement commercialisés

Il y a actuellement un produit commercialisé en Europe que l'on peut acheter sur différents sites de nutrition sportive. C'est un produit qui est scientifiquement testé actuellement par une équipe anglaise dirigée par Andrew M. Jones (Sport and Health Sciences, University of Exeter, St. Luke's Campus, Exeter EX12LU, UK).

Ce produit est sous forme de boisson déjà diluée, monodose de 70 ml le plus souvent et vendu entre 2 et 3.5 euro la dose. Il a ensuite était décliné sous plusieurs formes (grande bouteille, barres…).

http://beet-it.us/

http://www.jameswhite.co.uk/beet_it

http://www.okidosport-nutrition.com/beet-it-sport-oxyde-nitric,fr,4,JW-BI.cfm

http://www.wiggle.fr/boisson-beet-it-pro-elite-shot-15-x-70-ml/?lang=fr&curr=EUR&dest=11&sku=5360701410&utm_source=google&utm_term&utm_ca

Annexe 2 _ Document listant les consignes à respecter pour les participants aux différentes études

Consignes à respecter

Dans le cadre d'un protocole de recherche clinique, une évaluation dans différentes conditions expérimentales exige de standardiser au maximum la réalisation des examens. Pour ce protocole, vous devez effectuer 4 tests d'efforts espacés de 4 jours minimum. Les quatre tests d'efforts doivent être effectués le plus possible dans les mêmes conditions. La seule différence notable entre les 4 tests sera le complément alimentaire que l'on vous demandera d'ingérer, et dont vous ne connaitrez pas la composition.

L'alimentation

L'objectif de l'étude est d'analyser l'effet de l'ion Nitrate, de l'acide aminé L-citrulline et l'acide aminé L-arginine. Ces trois molécules sont disponibles dans certains aliments dans des proportions différentes. Il est donc important durant les 4 jours précédant chaque test de limiter au maximum les aliments fournissant ces trois éléments. Voici la liste des aliments à éviter pendant les 3 jours avant la passation de chaque test.

Concernant le nitrate

Le nitrate est abondant dans certains légumes et fruits, et présent dans les viandes salées (bacon, jambon cru…). Voici une liste des légumes et fruits à limiter ou éviter les jours précédant chaque test.

Aucun légume des groupes 3, 4, 5 ne doit être consommé dans les 3 jours précédant le test. Les légumes du groupe 1 et 2 doivent être consommés en petites quantités.

- Fruits : Fraise, Groseille, Framboise, Cerise et Pomme.
- Légumes : il y a 5 catégories principales de légumes :

  Groupe 1 : < 200 mg.kg-1 : asperge, champignon, pomme de terre blanche, tomate.

  Groupe 2 : < 500 mg.kg-1 : brocoli, chou-fleur, concombre, oignon, navet.

  Groupe 3 : < 1000 mg.kg-1 : haricot vert, chou, carotte.

  Groupe 4 : < 2500 mg.kg-1 : endive, rhubarbe, persil, poireau.

  Groupe 5 : > 2500 mg.kg-1 : betterave, céleri, laitue, épinard, radis, salade

En plus de cette liste, de façon générale, il faut éviter au maximum tout ce qui est racine, qui est en contact direct avec les produits agricoles nitrés répandus sur les exploitations. Les viandes salées sont à limiter au maximum, au moins les deux jours avant chaque test. Mortadelle, jambon, saucisses de Francfort, viandes séchées/fumées (saucisson, carpaccio, bacon).

Concernant l'arginine

Aliments à éviter : (pas plus de 50g)

Fruits secs (Les cacahuètes, les graines de sésame et de tournesol, les arachides, les noix et noix de cajou, noisettes, les pistaches, œuf, poisson : thon, saumon, crevette.

Aliments à limiter : (pas plus de 200g)

Lentilles, poulet, avoine, soja, blé, maïs, riz, et le sarrasin, ainsi que la viande rouge, le poisson, les produits laitiers.

Concernant la Citrulline

La citrulline est moins abondante que l'arginine dans l'alimentation.

La pastèque contient de forte dose de citrulline de l'ordre de 0,7 à 3,6 $g \cdot kg^{-1}$.

Eviter donc de manger plus de 250 g de pastèque

Si vous avez le moindre doute concernant la composition d'un aliment ou d'une boisson, n'hésitez pas à nous contacter.

Autres aliments ou boissons à éviter

- Tous les produits énergétiques (barres, boissons…)
- Les produits à base de taurine, caféine, thé vert, (type Redbull, Monster …)
- Le café ou thé avant les expérimentations
- Tout complément alimentaire la semaine qui précède les tests
- Aucune médication chronique importante, à juger durant la première visite.
- Eviter une consommation d'alcool excessive ; supérieur à 2 unités (ou verres) d'alcool, les deux jours précédant le test

Activité physique

Il est important d'éviter toute activité physique les deux jours précédant les tests d'efforts, et d'éviter une activité physique intense (sortie longue en montagne, compétition, sortie longue en vélo, entrainement prolongé équivalent au format stage, journée entière ou demi-journée de ski alpin ou de ski de fond…) la semaine précédant les tests. Il faut prendre en compte qu'une journée, ou une demi-journée de maçonnerie, de jardinage, de cueillette, de peinture, doit être considérée comme de l'activité physique.

Habitudes et hygiène de vie

- Le temps de sommeil pendant les jours précédant les tests doit être dans la mesure du possible identique. Aucun des quatre tests ne doit se faire avec une différence notable dans le nombre d'heure de sommeil comparé aux autres,
- Aucun bain de bouche désinfectant ne doit être utilisé le jour du test,
- Pas de consommation de tabac (le jour du test),
- Pas d'hydratation ou de déshydratation excessive,
- Pas de test dans le cas d'une infection en phase aigüe (température, courbature, rhume…)

Relevé des repas

Les trois jours précédant les tests vous devez relever, sur une feuille prévue à cet effet, les différents repas que vous effectuez. Ceci n'est pas fait pour vérifier si vous mangez correctement ou non, mais pour évaluer approximativement la dose de nitrate/citrulline/arginine que vous avez pu ingérer les trois jours d'avant. Ces données seront enregistrées et prises en compte lors de l'analyse des données. Ceci est à faire pour les trois jours, avant les 4 tests. Vous avez donc 12 feuilles à remplir.

Pour chaque repas, il faut indiquer la nature de l'aliment et la quantité ingérée. Sans peser, il suffit de l'indiquer à peu près en gramme (gramme de pâtes, de riz, de viandes…), ou en nombre (tranche de pain, nombre de légume, nombre de fruit). Ceci permettra juste de différencier les doses importantes de nitrate, citrulline, et arginine, des doses faibles. Si c'est un plat entier (choucroute, tartiflette, pot au feu, couscous...), indiquer seulement le nom du plat.

Exemple : Riz (90g) + courgettes (2) + blanc de poulet (1) + tranche de pain (1) + yaourt (1) + fromage (1 morceau)

Relevé de l'activité physique

Sur chaque feuille de relevé, présente à la suite, une colonne située à droite sert à quantifier l'activité physique. Comme pour les repas, il ne s'agit pas de connaitre précisément votre emploi du temps sportif, l'objectif est de savoir si oui ou non les trois jours avant le test ont pu influencer la performance sur le test physique.

Le but est d'indiquer la nature de l'activité, le nombre d'heure et l'intensité de façon objective (chrono, distance parcourue, dénivelé) ou subjective avec le ressenti (très fatigant, très intense…). Il est important de prendre en compte encore une fois, qu'une journée ou une demi-journée de maçonnerie, de jardinage, de cueillette, de peinture, peuvent être considérée comme de l'activité physique.

Exemple : Ski de fond, 1h15, balade, pas trop fatigant, ou Entrainement athlétisme (préparation demi-fond), 1h35, très intense et très fatigant

Annexe 3 _ Questionnaire et relevé des repas et activités les deux jours précédant les sessions d'évaluations

QUESTIONNAIRE ALIMENTAIRE / MODE DE VIE

Nom : Date :

Prénom : Date de naissance :

Veuillez noter vos aliments et boissons des 48 dernières heures

Av. hier matin	
Av. hier midi	
Av. hier soir	
Hier matin	
Hier midi	
Hier soir	
Ce matin	

Collations le jour du test :

Aliments spécifiques :

- Café : ☐ Quantité :

- Alcool : ☐ Quantité :

- Boissons énergisantes : ☐ Quantité :

Mode de vie

Etes-vous ?

Végétarien ☐

Végétalien ☐

Omnivore ☐

Aucun régime particulier ☐

Pratiquez-vous des bains de bouches ?

Jamais ☐

Moins de 1/mois ☐

>1 /semaine ☐

quotidien ☐

En avez-vous utilisé le jour du test ? Oui ☐ Non ☐

Veuillez noter la date et l'intensité de votre dernière séance de sport :

Activités	Date	Durée	Intensité de 0 à 10
			/10
			/10
			/10
			/10

Annexe 4 _ Données détaillées du nombre de contraction lors du test d'effort icrémental d'extension du quadriceps utilisé dans la publication 2

A	Nombre de contraction		
	PLA	N+C	DELTA
ALAN	85	96	11
ALDE	63	72	9
ALTH	40	41	1
CYBA	95	105	10
DEHE	93	96	3
JULA	34	33	-1
KECH	34	41	7
KERI	45	52	7
MADU	186	146	-40
KEVA	98	109	11
SAHA	44	43	-1
SYBE	43	43	0
THGR	96	109	13
THVI	73	79	6
VADE	49	55	6
Moyenne	**71.9**	**74.7**	**2.8**
Ecart-T	**39.9**	**34.0**	**12.7**
Amélioration de la performance (%)			**3.9**
Test de student p =			**0.204**

B	Nombre de contraction		
	PLA	N+C	DELTA
ALAN	85	96	11
ALDE	63	72	9
ALTH	40	41	1
CYBA	95	105	10
DEHE	93	96	3
JULA	34	33	-1
KECH	34	41	7
KERI	45	52	7
KEVA	98	109	11
SAHA	44	43	-1
SYBE	43	43	0
THGR	96	109	13
THVI	73	79	6
VADE	49	55	6
Moyenne	**63.7**	**69.6**	**5.9**
Ecart-T	**25.3**	**28.8**	**4.8**
Amélioration de la performance (%)			**9.2**
Test de student p =			**0.000**

Panel A, n = 15 ; Panel B, n = 14 ; PLA, placebo ; N+C, nitrate et citrulline

Figure 1 (Annexe). Nombre de contraction individuel durant le test incrémental d'extension du quadriceps (publication n°2)

Annexe 5 _ Programme d'entrainement utilisé dans la publication 4

Echauffement

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
20´ vélo progressif -> max = 65% FCmax + 5´ à intensité entre 65% et 80% FCmax	7’ de vélo 10 répétitions à vide 10 répétitions 15% de 1 RM 10 répétitions 25% de 1 RM 7 répétitions 45% de 1 RM 5 répétitions 65% de 1 RM Entre les séries : Etirements activo-dynamiques + squats à vide	10’ vélo ou rameur en fonction de la machine utilisée en premier Intensité progressive : 65% de Fc max !! Privilégier le vélo s’il est libre !!

SEMAINE 1

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
3 x 6 x 30’’/30’’ (T:95% PMA / R:40% PMA) Récupération entres les blocs 3’30 à 40% PMA	1) **Détermination du 1RM banc quadriceps** Objectif : trouver la charge pour 5RM (87% de 1RM) 7 à 8 séries maximum 2) **Séance Force 5 x 10 à 60% de 1RM** Récupération : 30’’ Ischio-jambier SWISSBALL + 30’’ gainage + 1’30 repos complet 3) **PPG** **Circuit training 3 x 6 (30’’/30’’) + Récup 2’** • exo 1: gainage avec SWISSBALL • exo 2: abduction bras avec haltères sur une jambe • exo 3 : abdos roulette • exo 4 : triceps élastique dans le dos • exo 5 : biceps élastique • exo 6 : abducteurs jambes pas chassés	3min/4min/5min/6min/4min/3min 65% / 70% / 75% / 70% / 65% /70% de la FC maximale 25’ vélo + 25’ rameur

SEMAINE 2

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
B1 : 30''/45''/1'/ 1'15/ 1'30 **B2 :** 1'30/1'15/1'/ 45''/ 30''/15'' **B3 :** 4 x 30´´ T <1' =95% PMA >1' =85% PMA Récupération = temps de travail Récupération entres blocs = 3'	**1) Force max :** 5x5 à 80% de 1RM Récupération 30'' Ischio-jambier relevé de bassin + 30'' gainage + 2min repos complet 2) **PPG** **Circuit training 3 x 8 (30''/30'') + Récup 2'30** • exo 1 : relevé bras devant avec haltères • exo 2 : abdos rameur • exo 3 : proprio jambe D rotations (yeux fermés) • exo 4 : pompes • exo 5 : mountain climbers • exo 6 : proprio jambe G rotations (yeux fermés) • exo 7 : dos (sur le ventre, rotations) • exo 8 : chaise	2min/5min/6min/7min/3min/2min 65% / 70% / 75% / 70% / 65% / 70% de la FC maximale 25' vélo + 25' rameur

SEMAINE 3

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
3 x 7 x 45´´/45´´ (T:95% PMA / R:40% PMA) Récupération entres les blocs 3’30 à 40% PMA	**1) Force max** **2 x** palier 1) 2x70% + R1 6x70% + R2 palier 2) 2x75% + R1 5x75% + R2 palier 3) 2x80% + R1 4x80% + R2 R1 90´´ = 30’’ gainage + 30’’ ischio-jambier R2 120’’ = Vélo Récupération : 3’30 entre les deux blocs 2) **PPG** **Circuit training 3 x 8 (35’’/25’’) + Récup 3’** • Exo 1 : papillon avec haltères • exo 2 : squat jump • exo 3 : planche latéral côté G • exo 4 : planche latéral côté D • exo 5 : proprio jambe G fléchie (rotation) + squat • exo 6 : proprio jambe D fléchie (rotation) + squat • exo 7 : abdos avec MB • exo 8 : biceps isométrique	3min/3min/4min/3min 70% / 80% / 70% / 80% 5min/3min/4min 75% / 80% / 70% 3min/2min 80% / 70% de la FC maximale 30’ vélo + 30’ rameur

SEMAINE 4

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
B1: 15''/30''/45''/1'/1'15/1'30/ 1'45/2' **B2** : 1'45/1'30/1'15/1'/45''/30'' /15'' **T** < 1min = 95% PMA >= 1min = 85% PMA Récupération entre séries : 10''/25''/35''/50''/1'/1'15/1'25/1'4 0 Récupération entres les blocs 3'30 à 40% PMA	**1) Force max** 5x70%; 4x75%; 3x80%; 4x80%; 3x80%; 4x75%; 5x70% de 1RM Récupération : 3´30 dont 1min ischio-jambier avec élastique 2) **PPG** **Circuit training 3 x 8 (40''/25'') + Récup 3'** • exo 1 : planche lever les bras en alternance • exo 2 : Triceps (élastique) extension explosive • exo 3 : Tirage menton avec élastique • exo 4 : Abdos roulette • exo 5 : travail abducteurs jambe G avec élastique • exo 6 : travail adducteurs jambe G avec élastique • exo 7 : travail abducteurs jambe D avec élastique • exo 8 : travail adducteurs jambe D avec élastique	3min/4min/3min/4min 70% / 80% / 70% / 80% 2min/3min/4min/3min/4min 65% / 70% / 80% / 70% / 80% de la FC maximale 30' vélo + 30' rameur

SEMAINE 5

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
3 x 7 x 40’’/30’’ (T:100% PMA / R:40% PMA) Récupération entres les blocs 4’ à 40% PMA	**1) Force max vélo** Sur vélo 2 x 8 x 45’’ à 45 tours minutes (45 rpm) Environ 100 % PMA + 15’ de vélo facile	1min/4min/4min/2min 65% / 70% / 75% / 70% 4min/2mn/4min/2min 80% / 65% / 80% / 70% 4min/2min 75% / 70% de la FC maximale 30’ vélo + 30’ rameur

SEMAINE 6

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
3 x 7 x 45''/40'' (T:95% PMA / R:40% PMA) Récupération entres les blocs 3'30 à 40% PMA	**1) Force max** **2 x** 8 x 70%; 6 x 75%; 5 x 80% Récupération : 3´dont 45´´ squat jump à droite et à gauche du step 3'30 entre les deux blocs 2) **PPG** **Circuit training 4 x 8 (30''/30'') + Récup 2' vélo** • exo 1 : maintien jambe tendu appuis sur les fesses • exo 2 : planche SWISSBALL (sur main bras tendus) • exo 3 : proprio jambe D abduction bras haltères • exo 4 : proprio jambe G tirage haltère lourde • exo 5 : pompe • exo 6 : biceps élastique • exo 7 : pas chassés élastique au niveau des genoux • exo 8 : adducteur : écrasement SWISSBALL	4min/5min/7min/1min 70% / 75% / 85% / 70% 9min/1min/4min/4min 85% / 70% / 80% / 70% de la FC maximale 35' vélo + 35' rameur

SEMAINE 7

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
3 x 10''/20''/30''/40''/50''/1'/50''/40''/30''/20''/10'' 95% PMA 40% Récup Récupération entre séries 20'' Récupération entre blocs 3'	**1) Force max** **2x** 6 x 65% ; 5 x 70%; 4 x 75%; 3 x 80% Récupération : 3' dont 45'' pliométrie avec MB; Récup entre blocs : 4' **2) PPG** **Circuit training 4 x 8 (35''/25'') + Récup 3' vélo** • exo 1 : rameur bras-jambes opposée • exo 2 : soulevé de fesses sur SWISSBALL • exo 3 : abdos rameur • exo 4 : Tirage élastique au niveau du menton • exo 5 : Abdos roulette • exo 6 : Tirage trapèze • exo 7 : chaise alterner appuis sur une jambe • exo 8 : triceps élastique	3min/6min/7min/8min/7min/4min 70% / 75% / 80% / 85% / 80% / 75% de la FC maximale 35' vélo + 35' rameur

SEMAINE 8

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
B1 : 2 x 10 x 45’’ 100% PMA B2 : 6 x 30’’ 100% PMA Récupération entre les séries B1 = 35-40’’ B2 = 25’’ Récupération entres les blocs 3’	1) Force max Travail excentrique avec élastique : freiner la descente 10 x 60%; 8 x 65%; 6 x 70%; 5 x 75%; 4 x 80%; 4 x 80%; Récupération : 3’30 dont 30’’ pliométrie avec MB + 30’’ isométrique : chaise Récup entre blocs : 4’ 2) PPG Circuit training 4 x 8 (45’’/30’’) + Récup 3’ vélo • exo 1 : fessiers jambe D élastique avec iso • exo 2 : fessiers jambe G élastique avec iso • exo 3 : planche bras sur SWIBALL (levé de bras) • exo 4 : biceps élastique avec iso • exo 5 : triceps élastique avec iso • exo 6 : abducteurs jambe D élastique avec iso • exo 7 : abducteurs jambe G élastique avec iso • exo 8 : roulette avec pause bras tendu	4min/6min/2min/6min 70% / 80% / 65% / 85% 2min/7min/2min/8min 65% / 85% / 65% / 85% 1min/2min 65% / 70% 40’ vélo + 40’ elliptique

Annexe 6 _ Tableau indiquant les intensités de travail pour chaque participant

NOM		Fréquence cardiaque maxiamale	188
PRENOM	**margaux**	Puissance maximale aérobie PMA	140
		1RM (Kg)	80

Echauffement

		15%	**12**		
65% PMA	**91**	25%	**20**	65% PMA	**91**
80% PMA	**112**	45%	**36**		
		65%	**52**		

SEMAINE 1

LUNDI		**MERCREDI**		**VENDREDI**	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**			Travail	
80%	**150**	Travail		%FCM	
		%1RM		65%	**122**
95% PMA	**133**	60%	**48**	70%	**132**
40% PMA	**56**			75%	**141**

SEMAINE 2

LUNDI		**MERCREDI**		**VENDREDI**	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**	Travail		Travail	
80%	**150**	%1RM		%FCM	
		80%	**64**	65%	**122**
95% PMA	**133**			70%	**132**
85% PMA	**119**			75%	**141**

SEMAINE 3

LUNDI		**MERCREDI**		**VENDREDI**	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**	Travail		Travail	
80%	**150**	%1RM		%FCM	
		70%	**56**	65%	**122**
95% PMA	**133**	75%	**60**	70%	**132**
		80%	**64**	80%	**150**

SEMAINE 4

LUNDI		**MERCREDI**		**VENDREDI**	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**	Travail			
80%	**150**	%1RM		Travail	
		70%	**56**	%FCM	
		75%	**60**	65%	**122**
95% PMA	**133**	80%	**64**	70%	**132**
85% PMA	**119**			80%	**150**

SEMAINE 5

LUNDI		MERCREDI		VENDREDI	
Echauffement		Echauffement		Echauffement	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**			Travail	
80%	**150**	Travail		%FCM	
		45 tours minutes (RPM)		65%	**122**
				70%	**132**
100% PMA	**140**	75% PMA	**105**	75%	**141**
				80%	**150**

SEMAINE 6

LUNDI		MERCREDI		VENDREDI	
Echauffement		Echauffement		Echauffement	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**			Travail	
80%	**150**	Travail		%FCM	
		%1RM		70%	**132**
		75%	**56**	75%	**141**
95% PMA	**133**	75%	**60**	80%	**150**
		80%	**64**	85%	**160**

SEMAINE 7

LUNDI		MERCREDI		VENDREDI	
Echauffement		Echauffement		Echauffement	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**	Travail		Travail	
80%	**150**	%1RM		%FCM	
		65%	**52**	70%	**132**
		70%	**56**	75%	**141**
95% PMA	**133**	75%	**60**	80%	**150**
90% PMA	**126**	80%	**64**	85%	**160**

SEMAINE 8

LUNDI		MERCREDI		VENDREDI	
Echauffement		Echauffement		Echauffement	
%FCM		%FCM		%FCM	
65%	**122**	65%	**122**	65%	**122**
70%	**132**	Travail			
80%	**150**	%1RM		Travail	
		60%	**48**	%FCM	
		65%	**52**	65%	**122**
		70%	**56**	70%	**132**
95% PMA	**133**	75%	**60**	80%	**150**
100% PMA	**140**	80%	**64**	85%	**160**

Annexe 7 _ Tableau de suivi des entrainements pour chaque participant

SUIVI DES ENTRAINEMENTS

NOM : PRÉNOM : CODE :

Date visite 1 : Date visite 2 :

Date PREV visite 3 : Date PREV visite 4 :

FCMax : FC REPOS : PMA :

TRIMP :
Durée x (FC exo-FC Repos/FCM-FC repos)
Durée dans chaque zone x Coefficient

%FCM	**ZONE**	**COEFFICIENT**
60-70%	2	2
70-80%	3	3
80-90%	4	4
90-100%	5	5

SEMAINE 1

LUNDI	**MERCREDI**	**VENDREDI**
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 2

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 3

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 4

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 5

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : WATT de travail cible : WATT de travail réel : Fréquence cardiaque de travail : TRIMP :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 6

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 7

LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

SEMAINE 8

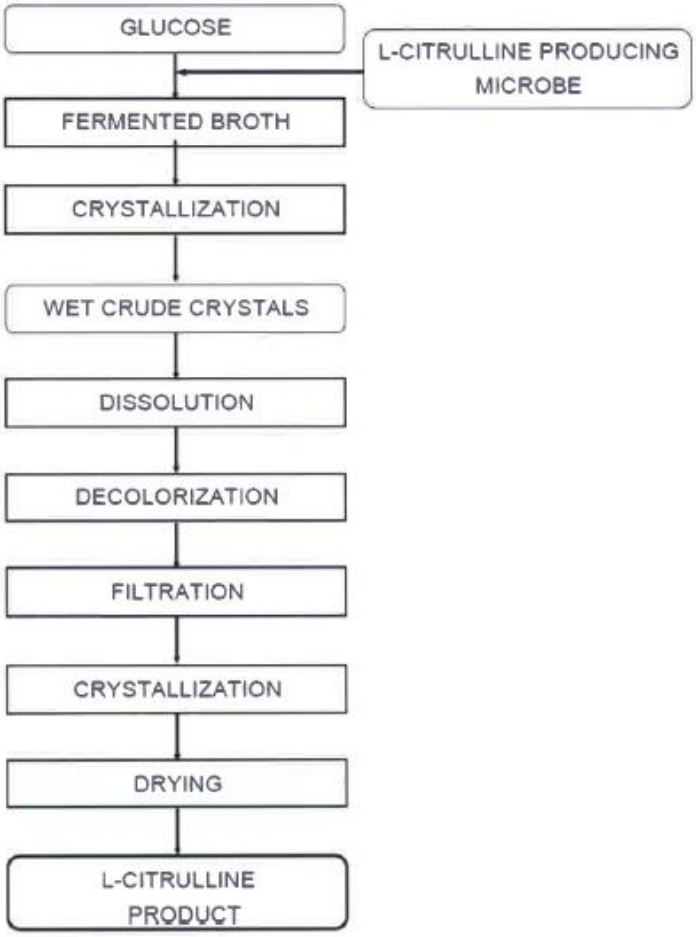
LUNDI	MERCREDI	VENDREDI
Heure :	Heure :	Heure :
PMA cible de travail : PMA cible de repos : PMA réelle exo : PMA réelle repos : TRIMP :	Fmax : Poids de travail cible : Poids de travail réel : Charge de travail cible : Charge de travail réelle :	Fréquence cardiaque de travail cible : Fréquence cardiaque de travail réelle : PMA de travail cible : TRIMP cible : TRIMP réelle :

Commentaires

Annexe 8 _ Flow chart de la L-citrulline utilisée dans les compléments alimentaires

CITRAGE – BIO & D
BAL N°1
94 Avenue du Général de Gaulle
94019 Créteil Cedex

Manufacturing Flow Chart of L-Citrulline



Origine : Etats-Unis

Fait à Créteil le 7 octobre 2014.

Dr Cécile Loï, Responsable Qualité.

CITRAGE^{S} - Bio & D
BAL n°1 - 94, av. du Gal de Gaulle
94 019 CRÉTEIL
Tel : +33 (0)9 81 15 47 56

Ces dernières années, la prévention des maladies cardiovasculaires chez l'homme est devenue un véritable enjeu de santé publique. Parmis les facteurs de risques, l'hypertension artérielle (30% des adultes en France) et la sédentarité (40% de la population française) sont majoritaiement impliquées dans les physiopathologies cardiovasculaires.

Une fonction vasculaire normale permet de contrôler le diamètre artériel, et la circulation sanguine. Par la production de substances vasoactives, l'endothélium vasculaire assure un équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction. L'une des substances vasodilatatrices majeures est le monoxyde d'azote (NO), synthétisé naturellement par l'organisme. La diminution de la biodisponibilité en NO, induisant une altération de la fonction vasculaire, peut être compensée par la prise de compléments alimentaires nommés précurseurs de NO. Bien que la littérature ait largement étudié l'effet de précurseurs de NO sur la santé et la performance à l'exercice, l'intérêt réel de ce type d'intervention nécessite d'être clarifié.

Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases is a major public health concern. Cardiovascular prevention is mainly underpinned by the control of cardiovascular risks. Among them, arterial hypertension (30% of adults in France) and sedentarity (40% of french population) represents two main targets in cardiovascular prevention.

A normal vasomotor endothelial function allows to regulate vascular tone. By synthesising vasoactive substances, vascular endothelium continuously maintains an optimal balance between vasodilation and vasoconstriction to match oxygen and energetic substrate supply to the demand. One major vasoactive substance is nitric oxide (NO), which is produced naturally in the body. The alteration of NO bioavailability can be offset, by consumption of food supplement, named NO precursor. Although the effects of NO precursor supplementation on health and exercise performance have been extensively studied, results are somehow controversial, mainly due to methodological discrepancies. Thus, the real interest of these types of interventions stays unclear.