HAL
open science

Metabolic and pathophysiological characterization of a postprandial model of endothelial dysfunction in rats. Potential benefits of a nutritional amino acids supplementation in prevention of cardiovascular risk

Joëlle Magné

To cite this version:

Joëlle Magné. Metabolic and pathophysiological characterization of a postprandial model of endothelial dysfunction in rats. Potential benefits of a nutritional amino acids supplementation in prevention of cardiovascular risk. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2009. English. NNT : 2009AGPT0038 . pastel-00005590

HAL Id: pastel-00005590

https://pastel.hal.science/pastel-00005590

Submitted on 23 Feb 2010

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.

N° /__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)

Spécialité : Physiologie de la nutrition

présentée et soutenue publiquement
par

Joëlle MAGNÉ

le 09 Juillet 2009

Caractérisation d'un modèle de dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain : Intérêt de la modulation de la nature des protéines en termes de prévention du risque cardiovasculaire

Directeur de thèse : ***Jean-François HUNEAU***

Codirecteur de thèse : ***François MARIOTTI***

Agroparistech-INRA, UMR914 Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire, Paris

Devant le jury :

M. Jean-François HUNEAU, Professeur, **Agroparistech**	**Président**
M. Michel FELETOU, Docteur, **Institut de recherches Servier**	**Rapporteur**
M. Dominique DARDEVET, Docteur, **INRA**	**Rapporteur**
Mme Catherine VERGELY, Professeur, **IFR**	**Examinateur**
Mme Blandine COMTE, Docteur, **INRA**	**Examinateur**
M. François MARIOTTI, Docteur, **Agroparistech**	**Examinateur**

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) est un Grand Etablissement dépendant du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, composé de l'INA PG, de l'ENGREF et de l'ENSIA (décret n° 2006-1592 du 13 décembre 2006)

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'UMR914 INRA-Agroparistech Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire, sous la direction de François Mariotti et de Jean-François Huneau, dans le cadre d'une allocation de recherche du Ministère de l'Education et de la Recherche.

Je tiens naturellement à adresser mes remerciements au Professeur Daniel Tomé de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je souhaite également adresser à Gilles Fromentin ma respectueuse considération.

Ma plus profonde gratitude est destinée à mes directeurs de thèse, François et Jean-Francois. Je remercie tout particulièrement François, dont l'encadrement, la disponibilité et le temps consacré à l'évaluation de ce travail, ont contribué, de façon inestimable, à la réussite de ce projet. Les échanges fructueux que nous avons nourris m'ont permis de bénéficier de vos connaissances et de vos compétences pointues. Enfin, l'investissement et la rigueur dans ce travail ne sont pas étrangers à l'atmosphère très conviviale de cet accompagnement. Encore merci.

Mes remerciements vont ensuite à Véronique Mathé qui a eu la gentillesse de m'accompagner tout au long de la thèse, et à Flore Giraudet, qui a participé avec enthousiasme à mes travaux. Je tiens également à remercier tous les chercheurs de l'équipe 3, (une équipe qui monte) Dominique Hermier, Annie Quignard-boulanger, Hélène Fouillet et Cécile Bos, qui à différentes étapes de la thèse, m'ont prodigués des conseils avisés. Vos encouragements ont été d'un grand soutien.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Michel Feletou et à Dominique Dardevet d'avoir accepté de rapporter mes travaux de thèse. Je remercie sincèrement Blandine Comte et Catherine Vergely d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je suis très reconnaissante au CETIOM (Centre Technique interprofessionnel des oléagineux) et à l'ONIDOL (Office national interprofessionnelle des oléagineux), d'avoir assuré le support financier d'une partie importante de ce travail. Je tiens ainsi à remercier Evelyne Feynard, Noémie Rousseaux, Jacques Evrard et Georges Vermeersch.

Je remercie chaleureusement le professeur Luc Rochette, de m'avoir si généreusement accueillie au sein de son laboratoire. J'exprime également mes remerciements à Stéphanie Delamasure et à Catherine Vergely, qui m'ont permis de bénéficier de leur savoir-faire avec enthousiasme.

Je souhaite exprimer mes plus vifs remerciements à tous les membres du Club NO France, qui m'ont permis de participer à ce merveilleux congrès en Autriche, qui a été une expérience extrêmement enrichissante et revitalisante. Une pensée particulière est destinée à Monique Dufhilo-David, dont les encouragements ont été d'un énorme soutien.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire et tout particulièrement les doctorants de l'UMR 914. J'adresse des pensées affectueuses à mes colocataires de bureau, Najoua et Montserrat. Vous avez su m'écouter, m'épauler et me communiquer toute l'énergie nécessaire pour avancer dans les moments difficiles. Ce fut un réel plaisir de partager ces deniers mois à vos cotés. Vais-faltar me. Merci également à ma coloc préférée des bas-fonds, pour ses rires communicatifs et son soutien, week-end et jours fériés inclus.

Enfin je garde mes plus vibrants remerciements pour la fin.

A la famille, l'amour, l'amitié et la fraternité.

A toi mon frère adoré, mon étoile du berger, celui sans qui je ne serais que bien peu de chose. Au-delà de tout ce que tu sais, merci de ton incrédulité silencieuse sans failles, celle que je lisais dans tes yeux quand je t'exprimais mes doutes à mener à bien ce projet. Rien n'a été autant rassurant.

A vous mes précieux amis de la « marternelle », gui, yann, bibine et sabrina. A fred, Sonia, chirstel, amenel, Vince et confidenza, j'ai trouvé en vous, soutien, respect et compréhension. A pa pawol an lè. Mèci on lo minm.

A mes trois modèles de femmes modernes, libres et indépendantes, Théodose, Joséphine et Lydia. Femmes debout avec une force de caractère que rien ni personne ne peut ébranler. Merci pour cette source intarissable d'inspiration.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES 8
LISTE DES TABLEAUX 11
LISTE DES ABREVIATIONS 12
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS 14

INTRODUCTION GENERALE 17

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 20

A. FONCTIONS ENDOTHELIALES ET ATHEROGENESE 21
1. EXPLORATION FONCTIONNELLE DE L'ENDOTHELIUM 21
1.1. Contrôle du tonus vasculaire 21
1.1.1. Stimulations physiques ou chimiques 22
1.1.2. Substances vasodilatatrices et vasodilatation NO-dépendante 23
1.2. Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale chez l'animal 24
1.3. Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale chez l'homme 25
1.3.1. Explorations invasives 25
1.3.2. Explorations non invasives 26
1.4. Importance des paramètres fonctionnels dans l'évaluation de la dysfonction endothéliale en termes de risque cardiovasculaire 27
2. Le NO, MOLECULE CLE DANS L'HOMEOSTASIE VASCULAIRE 29
2.1. Métabolisme du NO 29
2.1.1. Synthèse su NO 29
2.1.2. Contrôle de la production du NO 31
2.1.3. Régulation de la biodisponibilité du NO 32
2.2. Evaluation de la production/biodisponibilité du NO 35
2.2.1. Indicateurs de la capacité de synthèse du NO 35
2.2.2. Paramètres associés à la modulation de la biodisponibilité du NO 37
2.3. NO et physiopathologie de l'athérosclérose 39
2.3.1. Altération de la production du NO 39
2.3.2. Altération de la biodisponibilité du NO 40

3. EXPLORATION NON-FONCTIONNELLE DE L'ENDOTHELIUM 42
3.1. Endothélium, rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire 42
3.1.1. Stimuli métaboliques ou infectieux et voies de signalisation inflammatoire ... 42
3.1.2. Dysfonction endothéliale et activation endothéliale 44
3.2. Principaux marqueurs inflammatoires associés à de la dysfonction endothéliale 44
4. FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE ET INDUCTION DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE 46
4.1. Modèles génétiques de dysfonction endothéliale 47
4.2. Modèles d'induction nutritionnelle de dysfonction endothéliale 47

B. IMPORTANCE DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHEROSCLEROSE 49
1. DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE INDUITE PAR UNE HYPERGLYCEMIE 50
1.1. Hyperglycémie postprandiale et risque cardiovasculaire 50
1.2. Dysfonction endothéliale postprandiale induite par une hyperglycémie 51
2. REPAS DE CHARGE HYPERLIPIDIQUE ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE 52
2.1. Hypertriglycéridémie et risque cardiovasculaire 52
2.2. Charges pures ou repas mixtes ? 53
2.3. Quantités en lipides dans les repas de charge hyperlipidique 54
2.3.1. Doses de lipides utilisées 54
2.3.1. Quantités de lipides d'un repas hyperlipidique et dysfonction endothéliale postprandiale 54
2.4. Modulation de la qualité en macronutriments 56
2.4.1. Macronutriments utilisés et exposition lipémique 56
2.4.2. Qualité des lipides d'un repas hyperlipidique et dysfonction endothéliale postprandiale 56
3. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE 58
3.1. Inflammation à bas bruit et dysfonction endothéliale postprandiale 58
3.1.1. Marqueurs de l'inflammation à bas bruit postprandiale 58
3.1.2. Voies de signalisation impliquées 60
3.2. Stress oxydant et dysfonction endothéliale postprandiale 61

3.2.1. Marqueurs de stress oxydant postprandial 62
3.2.2. Supplémentation d'antioxydants et dysfonction endothéliale postprandiale 63
3.2.3. Stress oxydant postprandial et dégradation oxydative du NO 64

C. INTERET D'UN APPORT PROTEIQUE DANS LA MODULATION NUTRITIONNELLE DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE 66
1. APPORT EN ACIDES AMINES ET FONCTION ENDOTHELIALE 67
1.1. Modulation de l'apport en arginine 67
1.1.1. Métabolisme de l'arginine 67
1.1.2. Apport en arginine et dysfonction endothéliale 68
1.2. Apport en acides aminés soufrés et fonction endothéliale 70
1.2.1. Métabolisme des acides aminés soufrés 71
1.2.2. Apport en méthionine et dysfonction endothéliale 72
1.2.3. Cystéine, homéostasie redox et fonction endothéliale 74
2. APPORT PROTEIQUE ET FONCTION ENDOTHELIALE 77
2.1. Variations quantitatives en protéines et fonction endothéliale 77
2.2. Qualité des protéines alimentaires et dysfonction endothéliale 78

CONCLUSION ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX 81
ELEMENTS DE CHOIX METHODOLOGIQUES 83
1. Caractérisation de la dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain ... 83
1.1. Nécessité de développer une méthode d'exploration fonctionnelle de l'endothélium chez le rat vigile 83
1.2. Choix du repas de charge « high-fat meal » 84
1.3. Choix des paramètres de la dysfonction endothéliale à caractériser 85
2. Modulation de la nature des protéines d'un repas hyperlipidique sur la dysfonction endothéliale postprandiale, pourquoi les protéines de colza ? 85

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION D'UN MODELE DE DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE CHEZ LE RAT SAIN 87

Article 1: Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats 88

Article 2: Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue 98

CHAPITRE 3 : MODULATION DE LA NATURE DES PROTEINES D'UN REPAS HYPERLIPIDIQUE ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE 106

Article 3: Rapeseed protein in a high-fat mixed meal alleviates postprandial systemic and vascular oxidative stress and prevents vascular endothelial dysfunction in healthy rats 107

CHAPITRE 4 : DYSFONCTION ENDOTHELIALE INDUITE PAR UNE SURCHARGE EN METHIONINE : HYPERHOMOCYSTEINEMIE EXPERIMENTALE 119

Article 4: Vascular endothelial dysfunction in experimental post-methionine loading, hyperhomocysteinemia: mechanistic insights from a rat model 120

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 133

ANNEXE 138

Article 5: Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats 138

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE 149

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Médiateurs synthétisés et sécrétés par l'endothélium vasculaire

Figure 2 : Stimulation physique ou chimique de l'endothélium vasculaire

Figure 3 : Courbe d'inhibition de la relaxation vasculaire en réponse à la bradykinine sur des anneaux aortiques isolés de chien.

Figure 4 : Evaluation de la dysfonction endothéliale au niveau de l'artère brachiale à différents stades du développement des maladies pathologies coronaires

Figure 5 : Sonde utilisée pour la mesure de la FMD (A) et signal de FMD (B)

Figure 6 : Valeur pronostique de la mesure de la FMD pour la prédiction de la survenue d'accidents vasculaires coronariens

Figure 7 : Evaluation du la FMD en fonction du niveau de risque cardiovasculaire selon l'équation de Framingham

Figure 8 : Formes découplée (A) et couplée (B) de la NOS endothéliale

Figure 9 : Synthèse du NO à partir de la L-arginine

Figure 10 : Les trois isoformes de la NOS

Figure 11 : Cavéoles en microscopie électronique

Figure 12 : Modulation de la biodisponibilité de l'arginine

Figure 13 : Régulation de la biodisponibilité du NO au niveau systémique

Figure 14 : Réactions impliquant le NO au niveau des érythrocytes

Figure 15 : Distribution du NO au niveau du plasma

Figure 16 : Réactions impliquant les peroxynitrites

Figure 17 : Contribution de la NOS endothéliale à la formation de nitrites

Figure 18 : Voie de synthèse et de dégradation du NO

Figure 19 : Variations des nitrites, nitrates, NOx plasmatiques et FBF après administration d'acétylcholine

Figure 20 : Exemple de détection des nitrites, nitrosothiols et nitrosamines par chimioluminescence

Figure 21 : Deux types de guanylates cyclase au niveau des cellules musculaires lisses

Figure 22 : Production d'anions superoxydes lors du découplage de la NOS

Figure 23 : Dysfonction endothéliale et nitrites plasmatiques

Figure 24 : Risque cardivasculaire et nitrites plasmatiques

Figure 25 : Voies de signalisation des Toll-like récepteurs

Figure 26 : Notions d'inflammation à bas bruit ou de para-inflammation

Figure 27 : Dysfonction endothéliale et activation endothéliale

Figure 28 : Courbes de « survie » sans évènements athérothrombotiques selon des taux plasmatiques en CRP et de LDL

Figure 29 : Impact de la CRP sur l'activation endothéliale

Figure 30 : Dysfonction endothéliale et facteurs de risque cardiovasculaires

Figure 31 : Dysfonction endothéliale observée pendant la phase postprandiale

Figure 32 : Hyperglycémie et dysfonction endothéliale postprandiale

Figure 33 : FMD mesurée avant, 1h et 2h après un TOTG chez des sujets normo-glycémiques, insulino-sensibles ou atteints de DM2.

Figure 34 : TBARS plasmatiques mesurés avant, 1h et 2h après un TOTG chez des sujets normo-glycémiques (NGT), insulino-sensibles (IGT) ou atteints de DM2 (DM).

Figure 35 : Altération postprandiale de la FMD après l'ingestion d'un repas hyperlipidique ou de faibles doses de lipides

Figure 36 : Expression de marqueurs proinflammatoires au niveau de cellules endothéliales, cultivées en présence de lipoprotéines riches en triglycérides (TGRL).

Figure 37 : Le tissu adipeux, un organe endocrine

Figure 38 : Effets de repas hyperlipidiques et/ou TOTG sur la FMD et la 3-nitrotyrosine totale plasmatique chez des sujets sains ou atteints de DM2

Figure 39 : Métabolisme de l'arginine

Figure 40 : Effet de supplémentations en arginine sur la fonction endothéliale et la taille des lésions vasculaires chez des lapins hypercholestérolémiques

Figure 41 : Effet de supplémentations en arginine sur la taille de lésions athérosclérotiques chez des souris KO ApoE et KO ApoE/iNOS

Figure 42 : L'ingestion de 15g d'arginine entraine la réduction de la dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas hyperlipidique.

Figure 43 : Métabolisme de la méthionine

Figure 44 : Homocystéine plasmatique et FMD observée pendant les 24h suivant une charge en méthionine et 4h après différentes doses en méthionine

Figure 45 : Voies d'action du glutathion au niveau cellulaire

Figure 46 : Compartimentation cellulaire et subcellulaire des couples redox thiols/disulfures

Figure 47 : Valeur pronostic du potentiel redox de couple GSH/GSSG combinée à l'équation de Framingham chez des sujets sains.

Figure 48 : FMD mesurée chez des sujets sains selon des tertiles de la cystine ou de son disulfure mixte plasmatiques

Figure 49 : Expression d'eNOS, au niveau cardiaque, chez des rats hypertendus après une supplémentation en NAC.

Figure 50 : Effet d'une supplementation en cystéine ou d'un apport en protéines du lactosérum enrichies en α-lactalbumine sur la nitrotyrosine plasmatique chez des rats ayant reçu un régime hypersaccharosé

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Forte corrélation entre une hypertriglycéridémie et une dysfonction endothéliale vasculaire postprandiale

Tableau 2 : Etudes n'ayant pas rapporté d'altération postprandiale de la fonction endothéliale vasculaire

Tableau 3 : Qualité des acides gras et dysfonction endothéliale postprandiale

Tableau 4 : Inflammation à bas bruit et dysfonction endothéliale postprandiale

Tableau 5: Stress oxydant et dysfonction endothéliale postprandiale

Tableau 6 : Effet de supplémentations vitaminiques sur la dysfonction endothéliale postprandiale

Tableau 7 : Teneurs en arginine et en cystéine de différentes sources protéiques alimentaires

LISTE DES ABREVIATIONS

ADMA :	Diméthylarginine asymétrique
AGMI :	Acides gras monoinsaturés
AGPI :	Acides gras polyinsaturés
AGS :	Acides gras saturés
ANP :	Peptide natriurétique atrial
AIx :	Augmentation index ou index d'augmentation de la pression artérielle
BH_4 :	Tétrahydrobioptérine
CaM :	Complexe calcium-calmoduline
CAT-1 :	Transporteur des acides aminés cationiques type 1
CBS :	Cystathionine-β synthase
CRP :	Protéine C réactive
Cys :	Cystéine
CySS :	Cystine
DHA :	Acide docosahexanoïque
EDHF :	Facteur hyperpolarisant
eNOS :	Synthase du monoxyde d'azote endothéliale
EPA :	Acide eicosapentaènoïque
FBF :	Forearm blood flow ou Flux sanguin au niveau de l'avant bras
FMD :	Flow-mediated dilatation ou vasodilatation-dépendante du flux sanguin
GSH :	Glutahion réduit
GSH-Px :	Glutathion peroxydase
GSSG:	Glutathion oxydé
HAEC:	Human arterial endothelial cell
hsCRP :	Protéine C réactive ultrasensible
HTG :	Hypertriglycéridémie
HUVEC:	Human umbilical vascular endothelial cell
ICAM-1 :	Inter-cellular adhesion molecules-1
IGT :	Impaired glucose tolerance ou insulino-sensibilité
IL-1β:	Interleukin-1β
IL-6:	Interleukin-6
IL-8:	Interleukin-8
IMT:	Intima-media thickness ou épaisseur intima-media
iNOS :	Synthase du monoxyde d'azote inductible
KO:	Knock-out
L-NAME:	L-N^G-Nitroarginine methyl ester
L-NMMA:	L-N^G-monomethyl Arginine

LPS:	Lipopolysaccharide
MDA :	Malondialdéhyde
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
NAC :	N-acétylcystéine
ND :	Non décrit
NGT :	Normal glucose tolerance ou normo-glycémique
NO :	Monoxyde d'azote
NOS :	Synthase du monoxyde d'azote
NOx	Nitrites + nitrates:
3-NT:	3-nitrotyrosine
ORAC:	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAI-1:	Plasminogen activator inhibitor-1
PGI2 :	Prostacycline
PK:	Protéine kinase
PWV:	Pulse wave velocity ou vitesse de propagation de l'onde de pouls
RNNO :	S-nitrosamines
ROS:	Reactive oxygen species ou espèces réactives de l'oxygène
RSNO:	S-nitrosithiols
SAH:	S-adénosylhomocystéine
SAM:	S-adénosylméthionine
SOD:	Superoxyde dismutase
SHR:	Rats spontanément hypertendus
TBARS:	Thiobarbituric acid reactive substances
TGRL:	Liporotéines riches en triglycérides
TRAP:	Total radical-trapping antioxidant potential
DM2:	Diabète de type 2
TLR:	Toll-like récepteur
TNF-α:	Tnumor necrois factor-α
TOTG :	Test de tolérance orale au glucose
VCAM-1 :	Vascular cellular adhesion molecules-1
vWF :	Facteur vonWillebrand

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Magné J, Mariotti F, Fischer R, Mathé V, Tomé D, Huneau JF. Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2009 Apr 8. [Ahead of print]

Magné J, Huneau JF, Delemasure S, Rochette L, Tomé D, Mariotti F. Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats. Nitric Oxide, 2009 Aug;21(1):37-43.

Magné J, Huneau JF, Tsikas D, Delemasure S, Rochette L, Tomé D, Mariotti F. Rapeseed protein in a high-fat mixed meal alleviates postprandial systemic and vascular oxidative stress and prevents vascular endothelial dysfunction in healthy rats. The journal of nutrition, 2009, Sep; 139(9):1660-6.

Magné J, Mariotti F, Borderie D, Mathé V, Bos C, Huneau JF. Vascular endothelial dysfunction in experimental post-methionine loading, hyperhomocysteinemia: mechanistic insights from a rat model. En préparation.

Mariotti F, Hermier D, Sarrat C, **Magné J**, Fénart E, Evrard J, Tomé D, Huneau JF. Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats. British Journal of Nutrition. 2008 Nov;100(5):984-91.

COMMUNICATIONS ORALES

Magné J, Mariotti F, Tomé D, Huneau JF (2008). Decrease in whole-body nitric oxide production and impairment in downstream signalling in a rat model of postprandial endothelial dysfunction. Fifth International Conference: Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Autriche (résumé : Nitric Oxide 2008 19: S29-30).

Magné J, Fischer R, Mariotti F, Mathé V, Giraudet F, Tomé D, Huneau JF (2008). Early B-cells recruitment and activation of NF-B in adipose tissue are early features of postprandial

vascular endothelial dysfunction. Experimental biology, San Diego, USA (Abstract: FASEB J. 2008 22:298.5).

Magné J, Mariotti F, Tomé D, Huneau JF (2008). Including rapeseed protein in a high-fat meal prevents postprandial vascular endothelial dysfunction in rats. Experimental biology, San Diego, USA (Abstract: FASEB J. 2008 22:312.4).

Magné J, Fischer R, Mariotti F, Mathé V, Giraudet F, Tomé D, Huneau JF (2007). Early features of systemic and adipose-tissue low-grade inflammation in a model of postprandial endothelial dysfunction. Troisième conference de la société française de nutrition (SFN), Lille, France (Abstract: Proc Nutr Soc. 2008 May;67(OCE):E159).

Magné J, Mariotti F, Tomé D, Huneau JF (2006). Un modèle chez le rat pour l'étude de la dysfonction endothéliale postprandiale. Sixième journées francophones de nutrition, Nice, France.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Magné J, Mariotti F, Tsikas D, Tomé D, Huneau JF (2008). Rapeseed protein included in a high-fat meal reduces oxidative/nitrosative stress and loss in nitric oxide bioavailability in a rat model of postprandial vascular endothelial dysfunction. Fifth International Conference: Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Autriche (Résumé: Nitric Oxide 2008 19: S50).

Magné J, Mariotti F, Tsikas D, Tomé D, Huneau JF (2008). La nature des protéines d'un repas riche en acides gras saturés réduit le stress oxydant et la dysfonction endothéliale postprandiale. Cinquième congrès annuel de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose, Biarritz, France.

Magné J, Mariotti F, Tomé D, Huneau JF (2007). A rat model for studying the postprandial appearance of vascular endothelial dysfunction. Experimental biology, Washington, USA (Résumé: FASEB J. 2007 21:552.7).

Magné J, Mariotti F, Tomé D, Huneau JF (2007). Detection and characterization of postprandial endothelial dysfunction in conscious healthy rats. Tenth European Nutrition Conference at Paris, France.

INTRODUCTION GENERALE

Au cours de ces dix dernières années, les sciences de la nutrition se sont considérablement développées autour de concepts de nutrition préventive et d'aliments fonctionnels. Certains nutriments sont susceptibles de réduire ou prévenir l'apparition de dérégulations métaboliques alors que d'autres peuvent au contraire provoquer des cascades d'évènements délétères favorisant le développement de nombreuses pathologies telles les maladies cardiovasculaires athérothrombotiques. De ce fait, l'alimentation ne peut plus être considérée comme permettant exclusivement de satisfaire les besoins énergétiques et structuraux, il s'agit d'envisager les nutriments comme de véritables promoteurs de la santé (Roberfroid 1999; Roberfroid 2000). Cette réorientation de la recherche en nutrition a consisté, d'une part, à mettre en évidence le rôle délétère de certains nutriments et à préciser les phénomènes physiopathologiques impliqués et, d'autre part, à déterminer les qualités et les doses des nutriments potentiellement bénéfiques pour la santé.

Ce travail de thèse s'inscrit complètement dans cette dynamique de compréhension des évènements physiopathologiques de l'athérosclérose impliquant des facteurs nutritionnels. L'endothélium vasculaire, couche cellulaire à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire, joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie vasculaire et constitue une cible nutritionnelle privilégiée d'initiation et de prévention du risque cardiovasculaire (Brown et Hu 2001; Davignon et Ganz 2004; Landmesser *et al.* 2004; De Caterina *et al.* 2006).
Ainsi, de très nombreuses études ont démontré que tous les facteurs de risque cardiovasculaires induisaient une dysfonction endothéliale, considérée comme un phénomène central dans l'initiation et la progression des pathologies athérothrombotiques (Feletou et Vanhoutte 2006; Le Brocq *et al.* 2008). La dysfonction endothéliale, caractérisée par une altération de la production, de la biodisponibilité et de la signalisation de médiateurs sécrétés et/ou régulés par l'endothélium vasculaire, tel le monoxyde d'azote (NO), constitue un phénotype pro-athérogène complexe observé très précocement, avant même l'apparition des manifestations cliniques de dérégulations métaboliques et des pathologies cardiovasculaires (Bonetti *et al.* 2003; Davignon et Ganz 2004). Chez des sujets sains, il a ainsi été montré que l'ingestion d'un repas riche en acides gras saturés et/ou en saccharose induisait un ensemble d'évènements délétères et transitoires tel qu'une diminution de la réactivité vasculaire

associée à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et une élévation des marqueurs pro-inflammatoires, indiquant l'apparition d'une dysfonction endothéliale au cours de la phase postprandiale (Burdge et Calder 2005; Poppitt 2005; Sies *et al.* 2005; O'Keefe et Bell 2007). Comme les trois quarts de notre journée se déroulent en phase postprandiale, il a été suggéré que le risque nutritionnel cardiovasculaire se constituait progressivement par la répétition de ces évènements postprandiaux indésirables (Poppitt 2005). Ainsi, l'examen de la dysfonction endothéliale dans cette fenêtre d'étude postprandiale est tout à fait pertinent en ce qu'il permet d'analyser l'étape primordiale de la physiopathologie des désordres cardiovasculaires à son niveau d'apparition le plus précoce. En effet, alors que le rôle délétère de repas riches en acides gras saturés et/ou en saccharose sur la paroi vasculaire a été largement décrit et que la diminution de la production/biodisponibilité du NO, le stress oxydant et l'inflammation à bas bruit ont été identifiés comme les principaux mécanismes explicatifs, les voies de signalisation impliquées restent encore largement méconnues.

Par ailleurs, dans une perspective de nutrition préventive, de nombreuses approches nutritionnelles ont été examinées, telles des supplémentations vitaminiques, une modulation de la qualité des glucides ou de la qualité en acides gras, et les répercussions en termes de prévention du risque cardiovasculaire ont été considérablement documentées (Brown et Hu 2001; De Caterina *et al.* 2006). En revanche, il est étonnant de constater que, bien que certains acides aminés jouent un rôle important dans l'homéostasie vasculaire, très peu d'études ont examiné la possibilité que la fraction protéique d'un repas module la dysfonction endothéliale et le risque cardiovasculaire. Plusieurs travaux ont rapporté un effet bénéfique de supplémentations aiguës ou chroniques en arginine, précurseur du NO, sur la dysfonction endothéliale observée chez des sujets présentant un risque cardiovasculaire (Preli *et al.* 2002; Gornik et Creager 2004; Loscalzo 2004). Il a été également montré que l'apport alimentaire en acides aminés soufrés pouvait moduler la formation de composés métaboliques, tels que l'homocystéine et le glutathion, susceptibles de modifier certains paramètres de la fonction endothéliale vasculaire (Brosnan et Brosnan 2006; Huneau *et al.* 2008). Dans ce contexte, il nous est apparu particulièrement intéressant d'examiner les effets de protéines naturellement riches en arginine et en acides aminés soufrés sur la fonction endothéliale vasculaire.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons, dans un premier temps, cherché à caractériser chez le rat sain les principaux paramètres de la dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas riche en acides gras saturés et en saccharose afin de

préciser l'implication des voies de signalisation du NO et d'étudier les composantes de la réponse inflammatoire postprandiale. En utilisant ce modèle animal de dysfonction endothéliale, bien caractérisé par ce premier travail, nous avons ensuite examiné les effets d'une modulation de la nature de la fraction protéique du repas hyperlipidique sur les fonctions endothéliales vasculaires pendant la phase postprandiale.

Une présentation des principales méthodes et des différents marqueurs d'évaluation de la fonction endothéliale nous permettra de comprendre pourquoi la dysfonction endothéliale est actuellement considérée comme un phénomène majeur impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Nous développerons ensuite le cas particulièrement intéressant de phénotype précoce proatherogene que constitue la dysfonction endothéliale induite pendant la phase postprandiale, afin de dégager les principaux phénomènes impliqués.

Enfin, pour mieux appréhender l'intérêt d'un apport protéique dans la modulation nutritionnelle de la dysfonction endothéliale, nous analyserons d'un point de vue métabolique et physiopathologique, le potentiel de certains aminés à affecter la fonction endothéliale vasculaire.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. FONCTIONS ENDOTHELIALES ET ATHEROGENESE

L'endothélium vasculaire, couche cellulaire à l'interface entre le sang et la paroi vasculaire, joue un rôle essentiel et central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (Landmesser et al. 2004). Par la synthèse et la sécrétion d'un certain nombre de médiateurs **(Fig.1)** en réponse à des stimuli physiques ou chimiques, les cellules endothéliales vasculaires régulent le tonus vasculaire, l'activation et l'adhésion des leucocytes, la perméabilité vasculaire, la prolifération cellulaire ainsi que les mécanismes d'agrégation plaquettaire, de fibrinolyse et de coagulation (Cines *et al.* 1998; Toborek et Kaiser 1999; Michiels 2003). En utilisant différentes méthodes d'exploration fonctionnelle et/ou métabolique de l'endothélium vasculaire, de nombreuses études ont démontré que la dysfonction endothéliale était un phénomène clé impliqué dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose et un évènement très précoce dans le processus athérogène, précédant les premières manifestations cliniques (Bonetti *et al.* 2003; Davignon et Ganz 2004; Le Brocq *et al.* 2008). Ainsi, la dysfonction endothéliale a été décrite comme un phénotype pro-athérogène complexe caractérisé par une diminution du tonus vasculaire, une altération de la production/biodisponibilité du NO, associées à de l'inflammation à bas bruit et du stress oxydant. Afin de dégager la signification de ces différents paramètres évaluant la dysfonction endothéliale en termes de marqueur de risque cardiovasculaire, nous avons choisi d'aborder la fonction endothéliale sous un angle méthodologique. Il s'agira d'abord d'examiner les fonctions strictement liées à l'endothélium pour ensuite évaluer des biomarqueurs associés aux propriétés régulatrices de l'endothélium.

1. EXPLORATION FONCTIONNELLE DE L'ENDOTHELIUM

1.1. Contrôle du tonus vasculaire

Généralement, la première fonction de l'endothélium qui est évaluée est sa capacité à moduler le tonus vasculaire et le flux sanguin en réponse à des stimulations mécaniques ou chimiques. La nature, la durée et l'intensité de ces stimuli détectés par l'endothélium déterminent la libération par l'endothélium de substances vasodilatatrices telles le NO, la prostacycline (PGI2) et un facteur hyperpolarisant (EDHF) mais aussi des substances

vasoconstrictrices telles l'endothéline-1 et l'angiotensine AII. Grâce à des liaisons myoendothéliales, les cellules endothéliales communiquent directement avec les cellules musculaires lisses sous-jacentes, par la diffusion de ces substances vaso-actives qui induisent alors une contraction ou une relaxation vasculaire.

1.1.1. Stimulations physiques ou chimiques

Des substances endogènes telles l'acétylcholine, la noradrénaline, la substance P, la bradykinine ou la sérotonine, reconnues par des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G situés à la surface de l'endothélium sont utilisées comme stimuli pharmacologiques (Le Brocq et al. 2008). In vivo, ces substances doivent être administrées en intraveineuse à faibles doses, afin de minimiser des effets directs sur le tonus neurogène vasculaire et la pression artérielle. Historiquement, le rôle obligatoire de l'endothélium dans la relaxation vasculaire a été rapporté en 1980 par Furchgottt et Zawadski, à la suite de la stimulation de cellules endothéliales isolées par de l'acétylcholine (Furchgott et Zawadzki 1980). L'acétylcholine est devenue, par la suite, le stimulateur pharmacologique de l'endothélium le plus utilisé pour l'exploration fonctionnelle de l'endothélium. La découverte de Furchgott et Zawadski a établi qu'un facteur relaxant provenant de l'endothélium, identifié par la suite comme étant le monoxyde d'azote (NO), avait une contribution majeure dans la relaxation vasculaire induite par l'acétylcholine (Furchgott 1999). Ainsi, la fixation de l'acétylcholine à des récepteurs muscariniques **(Fig.2)** situés sur les membranes des cellules endothéliales, via une augmentation du calcium intracellulaire, provoque principalement une augmentation de la synthèse du NO, induisant une relaxation des cellules musculaires lisses.

Par ailleurs, le stress de cisaillement « shear stress » est largement utilisé comme stimulateur mécanique d'une réponse vasodilatatrice induite par l'endothélium. Ce stress ou contrainte de cisaillement est défini comme une force de frottement exercée tangentiellement sur les cellules endothéliales. Cette stimulation mécanique provoque principalement, via l'activation de voies Akt/kinases-dépendantes **(Fig.2)**, une libération du NO et d'EDHF induisant une vasodilatation-dépendante du flux sanguin ou « Flow-mediated dilatation » (FMD), qui se traduit par une diminution du flux sanguin. Dans la pratique chez l'homme, cette stimulation mécanique est souvent induite après une ischémie rapide suivie d'un relâchement progressif entrainant ainsi un retour veineux et une augmentation du stress de cisaillement (Burnstock 1999; Deanfield et al. 2005).

Il est important de noter que selon l'intensité de la stimulation, les lits vasculaires et/ou le diamètre vasculaire, les deux types de stimuli de l'endothélium décrits précédemment impliquent des voies de signalisations différentes avec une contribution variable des différentes substances vasodilatatrices. Ainsi, il a été montré que plus le diamètre artériel était faible et plus la contribution de l'EDHF à la vasodilatation induite par l'endothélium devenait prépondérante (Busse et al. 2002). L'estimation de la participation de ces substances vasodilatatrices aux paramètres mesurés lors de l'exploration fonctionnelle de l'endothélium sera souvent essentielle à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'altération cette réponse vasodilatatrice.

1.1.2. Substances vasodilatatrices et vasodilatation NO-dépendante

A ce jour, le NO, la prostacycline et l'EDHF sont les trois substances vasodilatatrices qui ont été décrites. Le NO, synthétisé à partir de la L-arginine, par une enzyme constitutive de l'endothélium, la NO synthase endothéliale (eNOS), peut diffuser au niveau des cellules musculaires lisses. La guanylate cyclase soluble est la principale cible du NO au niveau des cellules musculaires lisses. Ainsi, une fixation du NO au groupement hème de la guanylate cyclase entraine une activation du l'enzyme et une augmentation de la synthèse du GMPc **(Fig.2)**. L'influx de GMPc dans les cellules musculaires lisses provoque alors, une réduction de calcium intracellulaire, qui peut entrainer, via une diminution de l'état contractile et/ou une hyperpolarisation cellulaire, une relaxation des fibres musculaires lisses vasculaires (Carvajal *et al.* 2000; Friebe et Koesling 2003). L'utilisation d'inhibiteurs d'eNOS tels le L-NAME, le L-NMMA, ou encore des donneurs de NO tels le nitroprussiate de sodium ou la nitroglycérine a permis de démontrer que le NO jouait un rôle prépondérant dans la vasodilatation endothélium-dépendante (Alderton et al. 2001; Doshi et al. 2001). Ainsi, les réponses vasodilatatrices résistantes à l'action des inhibiteurs d'eNOS sont considérées comme NO-indépendantes.

Si la prostacycline, dérivé de la prostaglandine, synthétisé par des cyclooxygénases endothéliales (COX-1) à partir de l'acide arachidonique, exerce plutôt un rôle compensateur et protecteur en situation athérosclérotique, l'EDHF (facteur hyperpolarisant dérivant de l'endothélium) semble participer majoritairement à la vasodilatation NO-indépendante (Cheng *et al.* 2002; Klumpp *et al.* 2005; Quyyumi et Ozkor 2006). En effet, il a été montré sur des anneaux aortiques isolés de chien que toutes les réponses vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium supplémentaires observées malgré l'administration d'inhibiteurs du NO et de la

prostacycline ont été attribuées à l'EDHF **(Fig.3)**. Ainsi, l'EDHF, facteur non identifié, est actuellement défini comme une combinaison de médiateurs et de processus coordonnés par la stimulation de l'endothélium, et induisant une relaxation vasculaire via des mécanismes d'augmentation de conductance potassique et d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires (Busse et Fleming 2003; Feletou *et al.* 2003; Feletou et Vanhoutte 2004). Récemment, des inhibiteurs de la réponse vasodilatatrice attribués à l'EDHF ont été identifiés et des études sont actuellement en cours afin d'identifier ces différents mécanismes et leur impact dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

1.2. Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale chez l'animal

Historiquement, l'utilisation d'anneaux aortiques isolés de lapin a permis de démontrer le rôle obligatoire de l'endothélium dans la relaxation vasculaire (Furchgott et Zawadzki 1980). Cette méthode de bains d'organes isolés est devenue la technique standard d'exploration de la fonction endothéliale ex vivo. L'évaluation de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium est réalisée sur des segments artériels en réponse à différentes combinaisons de substances vaso-actives à l'aide d'un myographe. En outre, les mécanismes dépendants de l'endothélium impliqués dans des modulations de réponses vasodilatatrices peuvent être directement isolés grâce à la possibilité de dénuder les anneaux aortiques de l'endothélium. Cette technique a permis initialement d'identifier les effets délétères de certaines pathologies sur la fonction endothéliale (Angus et Wright 2000; Le Brocq *et al.* 2008). Il faut cependant signaler la nature artificielle de ces mesures ne reflétant pas le comportement physiologique des cellules endothéliales confrontées par nature à notamment des variations du flux sanguin.

Parallèlement aux méthodes d'exploration in vivo de la fonction endothéliale chez l'homme, des techniques hémodynamiques ont été développées chez l'animal (Heiss et al. 2008). Ainsi, des cathéters peuvent être placés au niveau de l'aorte, du sinus coronarien ou des artères fémorales afin de mesurer des variations des flux sanguins en réponse à des injections de substances vaso-actives administrées à l'aide de cathéters placés au niveau de la veine fémorale et/ou de la veine jugulaire externe (Le Brocq et al. 2008). Généralement, ces mesures sont réalisées sur des animaux anesthésiés, ce qui peut altérer les réponses hémodynamiques aux substances pharmacologiques. Actuellement, des systèmes de

pléthysmographie à occlusion veineuse et de télémétrie permettent de travailler sur des animaux vigiles.

1.3. Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale chez l'homme

1.3.1. Explorations invasives

Les premières études de la fonction endothéliale chez l'homme ont consisté en des mesures par angiographie quantitative de variations du diamètre des artères coronaires, en réponse à des perfusions locales d'acétylcholine à faibles doses. Actuellement, de nouvelles techniques d'échographie-doppler et d'ultrasonographie vasculaires ont remplacé l'angiographie quantitative pour l'évaluation des variations de flux sanguins coronariens (Deanfield et al. 2005; Le Brocq et al. 2008). Ces études de flux coronariens ont été les premières à mettre en évidence des altérations de la fonction endothéliale chez des sujets atteints de maladies coronariennes (Ludmer et al. 1986; Cox et al. 1989). Au regard de la forte prévalence de l'athérosclérose coronarienne, cette méthode permettant d'accéder directement à la circulation coronarienne est considérée comme le moyen le plus direct et le plus pertinent pour explorer des altérations de la fonction endothéliale en situation de pathologies athérothrombotiques, et présence de lésions coronariennes asymptomatiques. Cependant, la nature extrêmement invasive de cette technique (nécessitant une cathétérisation cardiaque) a limité son usage.

Il a été montré une lien positif **(Fig.4)** entre la mesure de la dysfonction endothéliale au niveau coronarien et celle au niveau de l'artère brachiale (Anderson et al. 1995). Ainsi, il est possible de mesurer des variations de débit sanguin au niveau de l'avant-bras « Forearm blood flow » (FBF,) après administration d'acétylcholine au niveau de l'artère brachiale. La résistance vasculaire est généralement évaluée par la mesure du débit sanguin et de la pression artérielle à l'aide d'un système de pléthysmographie par occlusion veineuse. Cette méthode est considérée beaucoup moins invasive pour l'homme mais la cathétérisation de l'artère brachiale limite son utilisation à grande échelle (Takase et al. 2005).

1.3.2. Explorations non invasives

Développé à l'origine par l'équipe de Celermajer au début des années 90, le « test d'hyperémie réactive » ou l'évaluation de la FMD consiste en la mesure de variations du diamètre de l'artère brachiale ou radiale en réponse à une contrainte de cisaillement (Celermajer et al. 1992). Une ischémie distale est produite grâce au gonflement du ballonnet d'occlusion d'un sphygmomanomètre et la variation post-ischémique du diamètre artériel est mesurée à l'aide d'un appareil échographie-doppler à haute résolution **(Fig.5A)**. Il a été démontré que la FMD était majoritairement NO-dépendante (Joannides et al. 2006; Deanfield et al. 2007). Cependant, il semble que la contribution du NO à la FMD soit très sensible aux caractéristiques de l'ischémie induite. Des changements de quelques centimètres de la position du ballonnet d'occlusion, ou encore des variations de la durée de l'occlusion, peuvent induire des réponses vasodilatatrices hétérogènes, plus ou moins représentatives d'une vasodilatation NO-dépendante (Angus et Wright 2000). Les paramètres de la mesure de FMD **(Fig.5B)** n'étant pas encore standardisés, des différences importantes intra-individuelles et entre des laboratoires différents expliquent un manque de répétabilité et de robustesse de cette technique (Donald et al. 2008). Cependant, parce qu'elle est non invasive et précise, cette méthode d'exploration de la fonction endothéliale est largement la plus utilisée en étude clinique.

Un peu en marge des précédentes techniques, toujours dans l'optique d'évaluer le tonus vasculaire au niveau périphérique, des démarches plus indirectes et plus mécaniques, ont été associées à une exploration non invasive de la fonction endothéliale. Ainsi, des variations de la rigidité artérielle, contrôlées seulement en partie par l'endothélium, peuvent être évaluées par la mesure de vitesse de propagation de l'onde de pouls « pulse wave velocity » (PWV) au niveau des artères périphériques, à l'aide d'un tonomètre appliqué au niveau des artères radiales ou carotides. D'autres paramètres de la rigidité artérielle comme l'index d'augmentation de la pression artérielle, ou AIx (Augmentation index), sont souvent utilisés et il a été montré qu'une augmentation de l'AIx était observée chez des sujets à risque cardiovasculaire (Oliver et Webb 2003; Woodman et Watts 2003). Cependant, des corrélations entre ces méthodes d'évaluation de la rigidité artérielle et la méthode de référence d'exploration de la fonction endothéliale au niveau de la circulation coronarienne n'ont pas encore été démontrées et les mécanismes impliqués dans la régulation de la rigidité artérielle par l'endothélium restent largement méconnus.

L'introduction de la technique d'évaluation du débit cutané par laser doppler a fait émerger la possibilité d'évaluer des variations endothélium-dépendantes de tonus vasculaire au niveau de la microcirculation cutanée (Le Brocq et al. 2008). En effet, des variations du débit artériolaire cutané sont observées en réponse à une contrainte de cisaillement ou à l'application locale de faibles doses de substances vaso-actives (l'acétylcholine et le nitroprussiate de sodium) qui migrent à travers la peau par iontophorèse. Il a été montré que l'évaluation de la réactivité vasculaire cutanée était très bien corrélée à la mesure de FMD chez des sujets sains, soulignant l'étroite relation entre des mesures faites sur des artères de gros calibres et celles faites sur des artérioles cutanées (<100µM) (Hansell et al. 2004). Cependant, alors qu'au niveau des vaisseaux de gros calibre le NO est le vasodilatateur principal, il est important de souligner que l'EDHF semble être la voie de signalisation prépondérante impliquée dans la régulation du tonus vasculaire au niveau de la microcirculation. Des altérations du débit artériolaire ont été observées chez des sujets à risque cardiovasculaire (hypertension artérielle, diabète de type 2) suggérant ainsi que la voie EDHF pourrait être aussi altéré dans certaines conditions lors de la physiopathologie de l'athérosclérose.

1.4. Importance des paramètres fonctionnels dans l'évaluation de la dysfonction endothéliale en termes de risque cardiovasculaire

De nombreuses études cliniques ont été réalisées dans le but de savoir si ces méthodes d'exploration in vivo de la fonction endothéliale étaient capables de détecter une probable dysfonction endothéliale chez des sujets ayant des manifestations cliniques des pathologies cardiovasculaires (Widlansky et al. 2003; Brevetti et al. 2008; Le Brocq et al. 2008). Ainsi, des études cas-témoins ont permis d'observer des altérations du FMD ou de flux coronariens chez sujets atteints de toutes les présentations de la pathologie athérothrombotiques (maladies coronaires, accidents vasculaires coronariens et artériopathies périphériques) par rapport à des sujets sains. Par ailleurs, on a remarqué que ces méthodes d'exploration fonctionnelle de l'endothélium détectait des altérations de la fonction endothéliale chez des sujets asymptomatiques à risque cardiovasculaire (Brunner *et al.* 2005; Grover-Paez et Zavalza-Gomez 2009). Ainsi, tous les principaux facteurs de risque cardiovasculaires tels l'hypertension artérielle, le diabète, l'hyperlipidémie, le tabagisme, l'hyperhomocystéinémie

sont associées à une diminution de la FMD et/ou du flux coronarien (Grover-Paez et Zavalza-Gomez 2009). Récemment, il a été rapporté que la combinaison de facteurs de risque observées lors du syndrome métabolique était également associée à une diminution de la FMD (Melikian et al. 2008). Par ailleurs, trois solides études prospectives ont démontré que l'altération du flux coronarien avait une valeur pronostique **(Fig.6)** en prédisant chez des sujets atteints maladies coronariennes ou asymptomatiques, la progression de la pathologie athérothrombotique ou la survenue d'évènements cardiovasculaires aigus tels l'infarctus du myocarde, l'angine de poitrine ou l'accident vasculaire coronaire (Schachinger et al. 2000; Suwaidi et al. 2000; Halcox et al. 2002). En outre, il a été montré que l'altération de la FMD chez des sujets à risque cardiovasculaire (hypertension artérielle) prédisait la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (Perticone et al. 2001; Quyyumi 2003). L'ensemble de ces études d'observation a permis de mettre en lumière le rôle central de la dysfonction endothéliale associée à tous les stades de développement et de progression de l'athérosclérose.

Une méta-analyse **(Fig.7)** a démontré que l'association entre facteurs de risque cardiovasculaire et la FMD pouvait être également très forte, dans des populations dont le risque cardiovasculaire était considéré comme faible selon l'équation de Framingham (Witte et al. 2005). Cette observation est en accord avec l'idée que la dysfonction endothéliale puisse aussi caractériser des phases très précoces du processus athérogène. En effet, des études cliniques chez l'homme et des études expérimentales chez l'animal ont démontré qu'une diminution de la FMD ou du flux coronarien était observée, dans la phase postprandiale, à la suite de l'ingestion d'un repas riche en glucides et/ou riche en lipides (de Koning et Rabelink 2002; Vigna *et al.* 2004). Ainsi, la fonction endothéliale, évaluée par la FMD constitue un marqueur de santé vasculaire qui permet de caractériser l'initiation et la progression du processus athérogène. Cette mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium permet non seulement de détecter et de discriminer des situations pré-pathologiques mais aussi d'apprécier l'effet de thérapeutiques sur la fonction endothéliale. Cependant, avant toute utilisation diagnostique, des améliorations concernant la standardisation et de reproductibilité des méthodes d'exploration *in vivo* de la fonction endothéliale restent à réaliser (Donald et al. 2008).

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la dysfonction endothéliale, il est essentiel d'appréhender l'exploration des autres fonctions de l'endothélium reflétées notamment par la physiologie vasculaire du NO.

2. Le NO, MOLECULE CLE DANS L'HOMEOSTASIE VASCULAIRE

Le NO, petite molécule labile, soluble à la fois dans les phases aqueuses et hydrophobes, peut diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires et agir aussi bien au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses que des plaquettes, des érythrocytes et des cellules de l'inflammation. Le NO est considéré comme une molécule-signal cytoprotectrice jouant un rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire (Yetik-Anacak et Catravas 2006). Cependant, il convient de garder en mémoire que le NO est aussi une espèce radicalaire qui donne naissance à des produits secondaires extrêmement cytotoxiques, en situation de stress oxydant (Thomas *et al.* 2008). Les quantités de NO retrouvées dans les cellules endothéliales sont ainsi très faibles et la production du NO est extrêmement régulée.

Par l'évaluation de multiples marqueurs du métabolisme du NO, de nombreuses études ont montré qu'une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium était étroitement associée à une diminution de la production et/ou de la biodisponibilité du NO (Maxwell 2002; Chatterjee et Catravas 2008). Il apparait donc essentiel d'examiner avec précision le métabolisme et les propriétés chimiques du NO afin de pouvoir analyser la pertinence des ces différents marqueurs de production/biodisponibilité du NO et de mieux comprendre la participation du NO dans la physiopathologie du processus athérosclérotique.

2.1. Métabolisme du NO

2.1.1. Synthèse su NO

Chez les mammifères, le NO est principalement produit à partir de la NO synthase (NOS) transformant la L-arginine en L-citrulline. La NOS est une métalloenzyme provenant de l'assemblage de 2 monomères **(Fig.8)** composés d'un domaine réductase C-terminal liant le NADPH et les cofacteurs flaviniques FMN et FAD et d'un domaine oxygénase N-terminal capable de lier le complexe calcium-calmoduline, CaM (Alderton et al. 2001). Isolés, ces monomères ont une très faible capacité de transfert électronique et sont incapables de lier le substrat, la L-Arginine et le cofacteur principal, la tétrahydrobioptérine (BH_4). L'enzyme n'est donc activable et fonctionnelle que sous sa forme homodimérique (Kawashima et Yokoyama 2004; Forstermann et Munzel 2006).

Le domaine oxygénase N-terminal est capable de fixer un groupement prosthétique héminique qui est le seul cofacteur nécessaire à la dimérisation de la NOS **(Fig.8A)**. Ce groupement hème permet le rapprochement et une interaction entre domaines réductase et oxygénase. Le transfert d'électrons à partir du NADPH est amélioré par la présence de l'hème et la capacité de réduction de l'oxygène en anions superoxyde est plus forte : on dit que l'enzyme est sous forme découplée (Munzel *et al.* 2005; Forstermann et Munzel 2006).
En effet, ce n'est qu'en présence de quantités suffisantes de L-arginine et de BH_4 **(Fig.8B)** que la NOS dimérique est capable de coupler l'hème et la réduction de l'oxygène, permettant ainsi l'hydroxylation d'un azote du groupement guanidium de la L-Arginine, formant ainsi un produit intermédiaire instable **(Fig.9)**, la Ng-hydroxy-L-Arginine (NOHA) qui se scinde rapidement en NO et en L-Citrulline : l'enzyme est alors sous sa forme active, couplée (Alderton *et al.* 2001; Forstermann et Munzel 2006). La notion de découplage de l'enzyme implique qu'en situation de diminution de la biodisponibilité du cofacteur BH_4 et/ou du substrat L-arginine, la NOS est capable de revenir sous sa forme dimérique découplée, générant alors des espèces réactives de l'oxygène tels les anions superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Munzel *et al.* 2005; Rabelink et Luscher 2006). Des diminutions de concentrations en BH_4 ont été observées dans des situations inflammatoires et pathologiques. Ainsi, cette capacité de la NOS à se découpler peut être considérée, dans certaines situations, comme un mécanisme médiateur de l'immunité induite (Schmidt et Alp 2007).

A ce jour, 3 isoformes de la NOS ont été identifiées **(Fig.10)** : la NOS neuronale (nNOS ou NOS-1) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS-3), qui sont constitutives, et la NOS inductible (iNOS ou NOS-2), qui est au contraire exprimée en réponse à des stimuli inflammatoires et à la présence d'agents pathogènes (Alderton *et al.* 2001; Witte et Barbul 2002; Schulz *et al.* 2005). Les NOS constitutives sont hautement régulées que ce soit au niveau transcriptionnel (expression et abondance) qu'au niveau post-traductionnel générant ainsi de faibles concentration de NO, de l'ordre du nM (Schulz et al. 2005). La NOS inductible est régulée principalement au niveau transcriptionnel et synthétise en général de fortes concentrations de NO, de l'ordre du µM, ce qui permet la neutralisation rapide des agents pathogènes (Kleinert et al. 2004). Une quatrième isoforme semble être retrouvée au niveau de la mitochondrie, cependant le gène de cette NOS mitochondriale n'a pas encore été identifiée (Ghafourifar et Cadenas 2005). Afin de comprendre comment la production du NO est modulée au niveau de l'endothélium, nous allons principalement focaliser notre exposé sur l'isoforme prédominante retrouvée dans la paroi vasculaire, la NOS endothéliale.

2.1.2. Contrôle de la production du NO

Comme indiqué précédemment, la NOS endothéliale est modulée par des modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles (Fleming et Busse 2003). Ainsi, des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation de certains résidus sérine et thréonine d'eNOS modulent son activité en réponse à des stimuli pharmacologiques ou mécaniques. En effet, en réponse à une contrainte de cisaillement, la phosphorylation de la Sérine 177 induit une activation d'eNOS alors qu'une déphosphorylation de la Thréonine 459 induit une activation de l'enzyme en réponse à la stimulation par la bradykinine. Ces régulations de l'activité eNOS impliquent une cascade de phosphatases et de kinases endothéliales, tels la PKB/Akt, la PKA et la PKC, activées notamment par un influx calcique (Fleming et Busse 2003; Schulz *et al.* 2005).
Par ailleurs, des études *in vitro* de cellules endothéliales à l'état basal (non stimulée) ont montré que l'activation d'eNOS était très compartimentée. En effet, eNOS est localisée dans des cavéoles **(Fig.11)**, des micro-domaines membranaires qui favorisent une sélection des signaux transmis par le NO. Des stimulations chimiques ou physiques de l'endothélium entrainent une augmentation de l'entrée de calcium dans les cellules endothéliales, induisant une activation du complexe CaM, et une activation de l'enzyme. Le flux de calcium permet également une dissociation d'eNOS des cavéoles et une internalisation de l'enzyme permettant le transport de la NOS qui conserve son activité catalytique dans l'espace sous-endothélial (Frank et al. 2003; Shaul 2003). La co-localisation dans la cavéole du transporteur d'acides aminés cationiques CAT-1 et de l'enzyme eNOS permet une mise à disposition idéale en L-arginine (McDonald et al. 1997; Closs et al. 2004). De plus, il a été montré que la fixation de protéines structurales et adaptatrices à eNOS permet une inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme (Kone et al. 2003). Ainsi, la localisation d'eNOS dans la cavéole permet non seulement son activation, son internalisation mais aussi son inhibition, structurant ainsi la production du NO en un compartiment particulier.

Parallèlement, l'activité catalytique de l'enzyme est très régulée par la biodisponibilité en son substrat principal, la L-arginine et en ses cofacteurs FAD, FMN et NADPH avec une mention spéciale pour la BH_4, cofacteur limitant essentiel à la stabilisation et l'activation de l'enzyme (Alp et Channon 2004; Schmidt et Alp 2007). Les concentrations en L-arginine dans les cavéoles sont de l'ordre du mM et le Km d'eNOS purifiée est de l'ordre du µM, ce

qui suggère, qu'en situation physiologique, l'enzyme est saturée en L-Arginine. En situation de pathologies athérothrombotiques, une réduction importante du transport en L-arginine par CAT-1 a été observée, réduisant ainsi la biodisponibilité en L-arginine (Kaye et al. 2000; Kaye et al. 2002). Au-delà du transport de l'arginine, plusieurs autres processus peuvent moduler la production du NO par une régulation de métabolisme de l'arginine. En effet, l'arginine, acide aminé non indispensable, est produit de façon endogène à partir de la L-citrulline, par l'action successive de l'arginosuccinate synthétase (ASS) et lyase (ASL) via un recyclage du pool endogène en arginine dans le cycle de l'urée (Hallemeesch et al. 2002; Morris 2002). L'utilisation de la L-arginine par eNOS peut être en compétition **(Fig.12)** avec d'autres voies de catabolisme de la L-arginine, tels l'arginase catabolisant la L-arginine en L-ornithine, ou encore l'enzyme mitochondriale arginine décarboxylase produisant de l'agmatine et du CO_2 (Morris 2004; Morris 2006). En outre, on sait que la méthylation de l'arginine protéique entraine, lors de la protéolyse, la formation d'un inhibiteur compétitif endogène d'eNOS, la diméthylarginine asymétrique (ADMA), pouvant induire une diminution de la production de NO (Boger 2003; Leiper et Vallance 2006). Ainsi, il a été montré que de fortes concentrations en ADMA étaient observées chez des sujets à risque cardiovasculaire et atteints de pathologies athérothrombotiques (Boger *et al.* 1998b; Boger *et al.* 2001; Perticone *et al.* 2005; Boger 2006).

Il est important de noter que la production et la biodisponibilité du NO sont très sensibles à des facteurs environnementaux tels le pH et les concentrations en dioxygène. En effet, en situation d'hypoxie, alors qu'eNOS, sous sa forme découplée, produit des anions superoxydes, le NO, stocké sous différentes formes, est mis à disposition (Schulz *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2008).

2.1.3. Régulation de la biodisponibilité du NO

L'activité physiologique du NO est fortement régulée par des mécanismes de stockage, de transport et de dégradation du NO. Le principal mécanisme de transduction du signal médié par le NO est la production de cGMP par la liaison au groupement hème des guanylates cyclases soluble **(Fig.13)**, exprimées non seulement au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, mais aussi au niveau des plaquettes (Lauer et al. 2002; Schulz et al. 2005). Ainsi, une fraction du NO synthétisé par l'endothélium diffuse dans la lumière vasculaire. Dans le sang, en fonction du compartiment plasmatique ou

érythrocytaire, le NO est rapidement oxydé en plusieurs métabolites (Elahi et al. 2007; Kleinbongard et al. 2007).

Au niveau des érythrocytes, le NO est très rapidement et majoritairement métabolisé en interagissant avec le groupement hème de l'hémoglobine **(Fig.13 et Fig.14)**. L'oxydation du NO par de l'oxyhémoglobine produit de la méthémoglobine (metHb) et des nitrates. La fixation du NO à la desoxyhémoglobine permet la formation de la nitrosylhémoglobine (NOHb). Le NO peut aussi réagir avec un résidu cystéine de l'hémoglobine, produisant alors de l'hémoglobine S-nytrosylée (Ozuyaman et al. 2008). L'hémoglobine peut être considérée comme le régulateur principal de la biodisponibilité et du transport du NO. Ainsi, il semblerait que des situations d'oxygénation élevée avec un pH normal, retrouvée dans le sang artériel, serait plus favorable à une oxydation du NO, alors que des situations de faible hypoxie et d'acidité, retrouvée dans le sang veineux, serait plus favorable à une libération du NO biodisponible. Cette hypothèse de gradient artério-veineux reste encore à démontrer par une évaluation des dérivés du NO au niveau des érythrocytes (Schulz et al. 2005). De plus, de très récentes études ont démontré l'existence d'une NOS endothéliale dans les érythrocytes, capable de produire localement du NO. Les érythrocytes semblent pouvoir représenter une réserve systémique autonome en NO (Kleinbongard *et al.* 2006b; Ozuyaman *et al.* 2008).

Dans le plasma, le principal produit d'oxydation du NO est l'ion nitrite, qui peut être immédiatement capté par les érythrocytes, et oxydé en ion nitrate, qui est alors redistribué au plasma **(Fig.15)**. De récentes études ont montré que les nitrites pouvaient être considérés comme un véritable réservoir du NO à partir duquel le NO pourra être redistribué (Lauer *et al.* 2002; Rassaf *et al.* 2002b; Rassaf *et al.* 2004). En effet, une conversion des nitrites en NO est possible, notamment par la réduction des nitrites par la xanthine oxydoréductase, mais aussi par une activité nitrite réductase de la désoxyhémoglobline (Godber et al. 2000; Bryan 2006; Roche et al. 2006; Elahi et al. 2007). Dans le plasma, le NO peut aussi rapidement réagir avec l'anion superoxyde et former des peroxynitrites, c'est le mécanisme plasmatique principal de réduction de la biodisponibilité du NO (Pacher et al. 2007). En tant qu'oxydants très réactifs, les peroxynitrites peuvent oxyder des thiols, des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et des lipides. A faibles doses, les peroxynitrites ne sont pas considérés comme cytotoxiques et les réactions d'oxydation induites peuvent avoir *a contrario* un rôle de transduction de certains signaux de détoxication (Pacher *et al.* 2007; Thomas *et al.* 2008). A plus fortes concentrations, les peroxynitrites plasmatiques en excès sont protonés et peuvent

être, soit transformés en nitrates, soit décomposés en radical hydroxyle et en radical dioxyde d'azote **(Fig.16)**. Le radical dioxyde d'azote est très réactif vis-à-vis de groupements phénoliques. Ainsi, la modification ou nitration de résidus tyrosine protéiques ou libres par une attaque au dioxyde d'azote entraine la formation de la 3-nitrotyrosine, considérée comme un produit terminal stable des peroxynitrites (Schulz et al. 2005; Pacher et al. 2007). En situation basale, la nitration de la tyrosine représente une modification protéique post-traductionnelle, qui permet une régulation de phénomènes métaboliques tels le renouvellement protéique ou la prolifération cellulaire.

Dans le plasma comme au niveau des érythrocytes, le NO peut réagir directement ou via la formation de peroxynitrites avec des groupements thiols et des groupements amines, formant ainsi des S-nitrosothiols (RSNO) et des S-nitrosamines (RNNO) (Hess et al. 2005; Derakhshan et al. 2007). Ces composés sont ensuite capables de nitrosyler un certain nombre de protéines. La S-nitrosylation est une nitrosylation (ou nitrosation) sur un groupement sulfhydryl, qui, quand il est liée à une cystéine intraprotéique, est considérée comme une modification post-transcriptionnelle, contrôlant l'activité, le renouvellement, la localisation et les interactions protéiques de nombreuses protéines tels la NOS, des facteurs de transcription, des récepteurs membranaires et des canaux ioniques (Hess *et al.* 2005; Zhang et Hogg 2005).

Il est intéressant de mentionner que tous ces dérivés du NO incluant entre autres les peroxynitrites, le dioxyde d'azote, les nitrosothiols, les nitrosamines sont regroupés sous le terme d'espèces réactives nitrosantes. Comme les espèces réactives de l'oxygène, ces dérivés du NO ont des effets physiologiques pléiotropes et leur formation est fortement régulée, en situation normale. En étroite association avec une dérégulation de la production d'espèces réactives d'oxygène (stress oxydant), des quantités élevées en espèces réactives nitrosantes (stress nitrosant) sont fortement corrélées avec la présence ou le développement de pathologies cardiovasculaires (Martinez et Andriantsitohaina 2009).

De nombreuses méthodes, directes et indirectes, plus ou moins sensibles et sélectives, ont été développées afin d'évaluer certains de ces métabolites du NO. Il convient donc de dégager les limites d'utilisation et d'interprétation de ces marqueurs de production et/ou de biodisponibilité du NO.

2.2. Evaluation de la production/biodisponibilité du NO

Il est important de noter que la frontière entre les notions de production et de biodisponibilité du NO est souvent étroite, voire artificielle. Prenons l'exemple des nitrites, en tant que dérivés du NO, nous avons pris le parti de les presenter comme un marqueur associé à des modulations de biodisponibilité du NO. Cependant, il a été montré que les concentrations en nitrites plasmatiques étaient très bien corrélées **(Fig.17)** avec des variations d'activité eNOS (Kleinbongard et al. 2003). C'est pour cela que pour plus de clarté, nous définirons que l'évaluation de la production du NO ou la capacité de synthèse du NO aura pour principal but de rendre compte directement ou indirectement de variations d'expression et/ou d'activité eNOS. L'évaluation de paramètres associés à des variations de biodisponibilité du NO aura plutôt pour objectif de mesurer l'utilisation, la consommation ou la dégradation du NO en différents dérivés du NO.

2.2.1. Indicateurs de la capacité de synthèse du NO

Chez l'animal, le prélèvement après sacrifice de tissus vasculaires permet facilement une évaluation tissulaire de la production du NO par une mesure du niveau d'expression d'eNOS, associée à une quantification tissulaire d'eNOS phosphorylée sur la sérine 1177, souvent considérée comme la forme activée de l'enzyme. Une évaluation de la biodisponibilité de certains cofacteurs et inhibiteurs de la synthèse du NO permet de mesurer de façon indirecte l'activité eNOS. En effet, une étude récente a montré que les concentrations de BH_4 au niveau vasculaire, et non au niveau plasmatique, étaient un marqueur de l'état de couplage d'eNOS (Antoniades et al. 2007). Cependant, au regard de la très grande instabilité de la BH_4 (photosensible et rapidement oxydée), cette évaluation *ex vivo* de la capacité de production du NO n'apparait pas très précise ni reproductible (Schmidt et Alp 2007). L'ADMA, en tant qu'inhibiteur endogène compétitif d'eNOS, pourrait être considéré comme un marqueur indirect de l'altération de la production du NO. De nombreuses études ont montré qu'une augmentation de l'ADMA plasmatique était observée non seulement chez des sujets atteints de maladies cardiovasculaires mais aussi chez des sujets à risque (hyperhomocystéinémie), par comparaison aux concentrations des sujets sains (Boger *et al.* 1998b; Boger 2003; Perticone *et al.* 2005; Boger 2006). Cependant aucune étude n'a

démontré la pertinence de la quantification de l'ADMA, au niveau systémique ou au niveau vasculaire, à évaluer une modulation physiologique de la production du NO.

Par ailleurs, le développement de techniques utilisant des isotopes stables appliquées au métabolisme du NO a permis de mesurer spécifiquement la synthèse du NO *in vivo* (Castillo *et al.* 1996; Moshage 1997; Luiking et Deutz 2003). En effet, comme la production du NO ne correspond qu'à environ 0,26-1% du flux plasmatique d'arginine chez l'homme sain, marquer la L-arginine au niveau de l'azote de son groupement guanidium qui est spécifiquement utilisé par la NOS, permet de discriminer la voie de synthèse du NO **(Fig.18)**. Après une perfusion ou une injection intraveineuse d'une dose traceuse de $^{15}N_2$-(guanido)-arginine, des enrichissements isotopiques en différents métabolites du NO, au niveau plasmatique ou urinaire, peuvent être mesurés de façon très précise par une analyse par spectrométrie de masse. En effet, la mesure de l'enrichissement isotopique en [^{15}N] citrulline ou des [^{15}N] nitrites au niveau du plasma, ou encore en [^{15}N] nitrates au niveau des urines, permet une évaluation du taux de production du NO corps entier (Luiking et Deutz 2003; Bryan et Grisham 2007). D'importantes précautions sont à prendre quant à la dose, la durée, la vitesse de perfusion traceuse d'arginine administré et le délai de mesure de l'enrichissement. En effet, il a été montré chez des sujets sains que, lorsque la [^{15}N] arginine était administrée en intraveineuse, plus de 95% de l'azote marqué était métabolisé en [^{15}N] citrulline au niveau du plasma dès les 30 premières minutes, et que plus de 80% de cet azote marqué était retrouvée au niveau des nitrates urinaires lors de 12 premières heures après l'injection (Castillo *et al.* 1996; Avogaro *et al.* 2003; Bryan et Grisham 2007). Cette méthode demande un haut niveau de technicité qui ne permet pas encore une utilisation en routine mais représente une technique originale et très précise de mesure de production du NO.
Il convient toutefois de noter qu'au regard de la forte instabilité du NO, mesurer directement de la production du NO se révèle être très compliqué, voire impossible. Le développement de technique de piégeage du NO par des complexes ferriques, représentant alors des adduits paramagnétiques du NO stables, qui pourront être ensuite mesurés par résonnance paramagnétique électronique, représente une voie prometteuse d'évaluation de la production du NO, non seulement au niveau du plasma mais aussi au niveau de l'hémoglobine (Kleschyov et al. 2007).

2.2.2. Paramètres associés à la modulation de la biodisponibilité du NO

Les nitrites et les nitrates ont été les premiers métabolites du NO à être fréquemment dosés au niveau plasmatique, comme marqueur de biodisponibilité du NO (Moshage *et al.* 1995; Bryan et Grisham 2007). Comme la production du NO par l'endothélium induit théoriquement une formation équimolaire de nitrates et de nitrites, l'évaluation des concentrations en nitrates et des nitrites plasmatiques (NOx) par un dosage colorimétrique a longtemps été considéré comme un marqueur de la biodisponibilité en NO (Moshage et al. 1995). Cependant en 2001, la magistrale étude de Lauer et al., confirmée ensuite par de nombreuses études, a permis de démontrer que seuls les nitrites plasmatiques **(Fig.19)** reflétaient véritablement des variations de la production du NO (Lauer et al. 2001). En effet, alors que les nitrites retrouvés dans le plasma proviennent essentiellement du NO, les nitrates plasmatiques sont modulés par de nombreuses sources d'apport en nitrates, indépendantes de la production de NO, au premier rang desquelles l'alimentation. Les nitrates sont en effet très présents dans l'alimentation, en quantité très variables ; les légumes, la viande et eau de boisson sont de forts contributeurs à l'apport en nitrates alimentaires (Lundberg et al. 2008). En outre, de récentes études ont démontré, chez des sujets sains, qu'une contrainte de cisaillement entrainait une augmentation en nitrites plasmatiques (et non des nitrates), qui était extrêmement bien corrélée avec l'augmentation du flux sanguin (Rassaf et al. 2006). Les nitrites plasmatiques sont donc considérés comme un marqueur de la production et de biodisponibilité du NO (Lundberg et Weitzberg 2005). Une attention toute particulière a été donnée à la précision et à la reproductibilité des méthodes de dosage des nitrites plasmatiques, en utilisant des techniques telles la GC-MS, la chimioluminescence ou l'analyse par injection en flux continu (Rassaf et al. 2004; Hendgen-Cotta et al. 2008). De plus, comme les nitrites ont une demi-vie très courte dans le sang (1-12 min) et que les sources de contamination en nitrites sont nombreuses, d'énormes précautions sont à prendre quant aux conditions pré-analytiques (Rassaf *et al.* 2004; Bryan et Grisham 2007).

La sensibilité de la technique de chimioluminescence **(Fig.20)** permet actuellement de doser les S-nitrosothiols dans le plasma et dans les tissus vasculaires (van Eijk et al. 2007). Une étude récente a montré qu'une diminution de S-nitrosothiols plasmatiques était observée chez des sujets à risque cardiovasculaire et était associé à une diminution de la FMD, suggérant ainsi que les RSNO pouvaient représenter un marqueur de la biodisponibilité du NO (Heiss et al. 2006). Cependant, l'alimentation semble moduler, artéfactuellement, les concentrations en RSNO plasmatiques et d'autres études restent à réaliser afin d'évaluer si les

concentrations plasmatiques en RSNO correspondent directement à des variations de la biodisponibilité du NO (Grau et al. 2007; van Eijk et al. 2007). Par ailleurs, dans les érythrocytes, la présence de protéines et de l'hémoglobine en particulier, rend délicat, pour l'instant, l'évaluation des RSNO par chimioluminescence. Ainsi, des techniques fiables d'évaluation de la biodisponibilité du NO dans les globules rouges, restent encore à mettre au point.

Des méthodes de quantification de 3-nitrotyrosine au niveau plasmatique ont été développées afin de rendre compte de la formation des peroxynitrites (Tsikas et Caidahl 2005). Cependant, au-delà de la production à partir des peroxynitrites, il a été récemment montré que la 3-nitrotyrosine était aussi synthétisée à partir d'autres espèces réactives nitrosantes (Duncan 2003). Alors que des modulations en 3-NT protéique plasmatique reflètent plus directement le degré de nitration des protéines, la 3-NT libre, présente à de plus faibles concentrations au niveau du plasma, semble plutôt être un biomarqueur du stress nitrosant (Tsikas et Caidahl 2005). Des techniques d'ELISA et de western blot utilisant des anticorps monoclonaux anti-NT permettent une évaluation simple et rapide de la 3-NT protéique, cependant de sérieuses réserves ont été émises quant à la sensibilité de ce dosage. Il est actuellement possible de mesurer de façon assez fine les faibles concentrations en 3-NT libre, présentes dans des conditions normales, par des méthodes de spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS). Des interférences dues aux phénomènes de nitration artéfactuelle et la très haute technicité nécessaire à l'utilisation de ces méthodes, sont de sérieuses entraves à l'évaluation de la 3-NT libre en routine (Tsikas et Caidahl 2005).

Une autre possibilité d'évaluer indirectement la biodisponibilité du NO est la mesure des concentrations plasmatiques deGMPc. En effet, le principal effecteur intracellulaire du NO étant la guanylate cyclase soluble, qui répond par la production de GMPc en grande quantité, le GMPc plasmatique peut être considéré comme un marqueur de la biodisponibilité du NO (Carvajal et al. 2000). Cependant, deux types de guanylates cyclases ont été identifiés au niveau des cellules musculaires lisses **(Fig.21)**, la guanylate cyclase soluble, NO-dépendante et la guanylate cyclase membranaire, non stimulée par le NO mais par des peptides natriurétiques. Ainsi, il a été montré que la production de GMPc était principalement stimulée par le NO et le peptide natriurértique atrial, ANP (Carvajal *et al.* 2000; Friebe et Koesling 2003). C'est pour cela que de nombreuses études ont utilisé ces variations de GMPc au niveau plasmatique et/ou vasculaire comme marqueur de la bioactivité du NO, en

supposant ou en vérifiant que les concentrations en ANP plasmatique restent inchangées (Mair et Puschendorf 1998).
Au regard de la complexité des voies de régulation du NO mais aussi des techniques de dosage des dérivés du NO, il apparait que ce n'est que par la combinaison de plusieurs marqueurs de la production et de la biodisponibilité du NO, qu'une évaluation pertinente des variations de la production et de la biodisponibilité du NO est possible.

2.3. NO et physiopathologie de l'athérosclérose

De nombreuses études ont suggéré qu'une altération de la production et/ou de la biodisponibilité du NO était le mécanisme principal impliqué dans la dysfonction endothéliale, observée lors de la pathogenèse de l'athérosclérose. Cependant, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose, il convient de d'analyser directement l'impact de modulations de production et/ou de biodisponibilité du NO dans l'initiation, le développement et la progression de pathologies cardiovasculaires.

2.3.1. Altération de la production du NO

Des études utilisant des modèles de lapins hypercholestérolémiques ont montré qu'une diminution de la synthèse du NO par l'administration chronique de L-NAME dans l'eau de boisson, accélérait l'apparition de plaques athérosclérotiques et de complications cardiovasculaires (Holm *et al.* 1997; Kauser *et al.* 2000; Kawashima et Yokoyama 2004). Sur des modèles animaux d'induction génétique de l'athérosclérose, les souris invalidées pour le gène de l'ApoE, l'invalidation génétique d'eNOS (souris à double invalidation ApoE et eNOS) ou l'inhibition chronique de la synthèse du NO (administration de L-NAME), entraine une accélération rapide de la progression de l'athérosclérose (Knowles *et al.* 2000; Kawashima et Yokoyama 2004). En outre, une exploration de vaisseaux humains à un stade avancé d'athérosclérose a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression d'eNOS (Kuhlencordt et al. 2004). Par ailleurs, l'administration chronique de L-arginine, substrat de la NOS, inhibe ou retarde la formation de plaques athéromateuses chez des lapins

athérosclérotiques (Cooke *et al.* 1991a; Cooke *et al.* 1991b; Cooke *et al.* 1992; Candipan *et al.* 1996). Cet ensemble d'observations suggère que, lors de pathologies ou situations à risque cardiovasculaire, la diminution de production du NO est un facteur contribuant à la progression de complications cardiovasculaires.

Cependant, de nombreuses études de modèles d'induction athérosclérotique ont aussi observé, à des stades précoces de l'athérosclérose, soit aucune variation de l'expression de la NOS, soit une augmentation de l'expression d'eNOS associées à une augmentation de la production vasculaire d'anion superoxyde (Shi et al. 2002). Ces travaux ont permis d'émettre l'hypothèse que, dans certaines conditions délétères, la surexpression d'eNOS conduirait à un découplage de l'enzyme qui contribuerait à la progression du processus athérosclérotique (Schmidt et Alp 2007). En effet, chez des souris transgéniques invalidées pour le gène de l'ApoE$^{-/-}$, la surexpression d'eNOS entraine une accélération de l'apparition de plaque athérosclérotique, associée à une augmentation de la production d'anions superoxydes (Ozaki et al. 2002). En outre, chez des souris ApoE$^{-/-}$ ou des lapins hypercholestérolémiques, une réduction de concentrations en BH_4 de près de 50% a été observée par rapport à des animaux sains, la déplétion en BH_4 étant connue pour favoriser le découplage de la NOS (Takaya et al. 2007). Ainsi, en situation d'athérosclérose ou d'hyperlipidémie, le mécanisme impliqué dans l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium semble principalement être la dérégulation de l'activité de la NOS, devenant découplée et produisant davantage d'anions superoxydes **(Fig.22)**.

Par ailleurs grâce à la technique traceur d'isotope stable, des diminutions de la production du NO ont été montrées dans des situations d'hypertension, de diabète de type2 et d'hypercholestérolémie (Forte et al. 1997; Avogaro et al. 2003; Maas et al. 2008). Ces situations à risque cardiovasculaire sont également associées étroitement à la production des sources d'espèces radicalaires de l'oxygène qui entraine alors une accélération de la dégradation du NO. Ainsi, le stress oxydant est considéré comme le phénomène clé impliqué dans la diminution de la biodisponibilité du NO.

2.3.2. Altération de la biodisponibilité du NO

De nombreuses études expérimentales ont observé une augmentation de la production de ROS au niveau des artères prélevées sur des animaux hypercholestérolémiques ou atteints de pathologies cardiovasculaires, en comparaison à des animaux sains (Ohara et al. 1993;

Mugge et al. 1994; Naseem 2005). Lors de ces études, l'utilisation d'anneaux aortiques dénudés a permis de montrer que l'endothélium était la principale source d'anions superoxyde et que cette production de ROS était probablement due à une activation de la NADPH oxydase et/ou de la xanthine oxydase (White et al. 1996; Warnholtz et al. 1999). En outre, des études d'intervention ont montré que l'administration de systèmes antioxydants comme la superoxyde dismutase (SOD) ou des vitamines antioxydantes, réduisait l'altération de la vasodilatation NO-dépendante observée chez des animaux atteints de pathologies athérosclérotiques (Naseem 2005). Ainsi, la production d'anions superoxydes, induisant une réduction de la biodisponibilité du NO, est considérée comme un phénomène clé impliqué dans la dysfonction endothéliale.

Afin d'évaluer plus directement la dégradation oxydative du NO, des variations en 3-NT plasmatiques ont été recherchées dans des situations de pathologies vasculaires ou à risque cardiovasculaire. Ainsi, l'équipe de Shishehbor a montré que des concentrations plasmatiques élevées en 3-NT protéique étaient observées chez des sujets atteints de maladies coronariennes, par rapport à des sujets sains, et étaient fortement corrélées avec la sévérité des maladies coronariennes (Shishehbor et al. 2003). De plus, il a été démontré qu'une hyperglycémie et une hypertriglycéridémie pouvait aussi induire une augmentation postprandiale de la 3-NT protéique plasmatique chez des sujets atteints de diabète de type 2 et chez des sujets sains (Ceriello et al. 2004).

Par ailleurs, l'équipe de Kleinbongard a observé qu'une diminution des concentrations en nitrites plasmatiques chez l'homme était un bon indicateur d'une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante **(Fig.23)**. Dans cette étude, les concentrations en nitrites plasmatiques étaient fortement corrélées aux facteurs de risque classique cardiovasculaire **(Fig.24)** tels l'hypertension, l'hypercholestérolémie et le tabagisme (Kleinbongard *et al.* 2006a). Deux études cas-témoin ont également montré que de plus faibles concentrations en nitrites et en GMPc plasmatiques, et également de plus faibles excrétions urinaires en GMPc, étaient observées chez des sujets en situation de syndrome métabolique (Cui et al. 2007; Gomes et al. 2008). Au même titre que des variations de FMD, il a été rapporté que des variations en nitrites plasmatiques pouvaient être considérées comme des marqueurs prédictifs de risque cardiovasculaire tels le diabète de type 2 et les artériopathies périphériques (Allen et al. 2009). Récemment, l'équipe de Kelm a suggéré qu'une modulation plasmatique en certains dérivés nitrosylés du NO (S-nitrosothiols et S-

nitrosamines) pouvait être considérée comme un paramètre pertinent d'évaluation de la biodisponibilité du NO et associé à une augmentation du risque cardiovasculaire (Heiss et al. 2006). Des études cliniques d'intervention à grande échelle et d'autres études expérimentales restent à réaliser afin de savoir si les nitrites, la 3-NT et les dérivés nitrosylés du NO plasmatiques peuvent être considérés comme des marqueurs de risque cardiovasculaire.
L'exploration fonctionnelle de l'endothélium vasculaire et l'utilisation de marqueurs de production et de biodisponibilité du NO ne rendent compte que de façon parcellaire des propriétés régulatrices de l'endothélium. Plusieurs autres marqueurs associés à la réponse inflammatoire sont utilisés comme des indicateurs de dysfonction endothéliale.

3. EXPLORATION NON-FONCTIONNELLE DE L'ENDOTHELIUM

3.1. Endothélium, rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire

En réponse à des dérégulations métaboliques et à des lésions vasculaires, l'activation de voies de signalisation et d'interactions cellulaires impliquant, principalement les cellules endothéliales et les leucocytes, favorise une adaptation rapide à ces situations d'agression et permet un maintien de l'homéostasie vasculaire. Par des cascades de synthèse, de sécrétion et d'activation de facteurs autocrines et paracrines, les cellules endothéliales sont au centre du contrôle de la réponse inflammatoire. En effet, l'endothélium joue un rôle fondamental dans des mécanismes de contrôle du tonus vasculaire, de l'hémostase, de la croissance cellulaire, de la perméabilité vasculaire et des interactions entre les cellules sanguines et la paroi vasculaire (Michiels 2003; Landmesser et al. 2004). La nature, l'intensité et la durée des stimulations déterminent les types de médiateurs libérés et les voies de signalisation activées.

3.1.1. Stimuli métaboliques ou infectieux et voies de signalisation inflammatoire

Classiquement, l'inflammation est décrite comme une réponse aiguë de forte intensité à des lésions tissulaires ou à une infection, induisant une dégradation de l'agent pathogène et une réparation tissulaire, et caractérisée symptomatiquement par un gonflement, une rougeur,

une douleur et une chaleur. Cette réponse inflammatoire infectieuse aiguë dite de l'immunité innée, est généralement organisée en quatre phases : la reconnaissance infectieuse, le recrutement cellulaire, l'élimination de l'agent pathogène et le retour à l'homéostasie (Barton 2008; Medzhitov 2008). Des récepteurs hautement conservés dits de l'immunité innée sont capables de reconnaitre des motifs moléculaires associés aux pathogènes (ou PAMP). Les Toll-like récepteurs (TLR) consituent la famille de récepteurs membranaires de l'immunité innée la mieux caractérisée, et, à ce jour, 10 membres de TLR sont connus et diffèrent par le type de motifs reconnus. Ainsi, la stimulation des TLR induit une activation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression de cytokines et autres médiateurs proinflammatoires **(Fig.25)**, ce qui permet un recrutement local de leucocytes au niveau de l'endothélium (Akira *et al.* 2001; Akira et Takeda 2004). Ainsi, la liaison de multiples PAMP, et notamment le LPS, au TLR4 via une cascade de signalisation entraine l'activation des facteurs de transcription NF-κB et IRF-3 et l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (tels IL-6, 8, 1, MCP-1) et des molécules d'adhésions tels VCAM-1, ICAM-1, sélectine-E (Akira *et al.* 2001; Li et Sun 2007).

Récemment, il a été montré que les TLR reconnaissaient également un certain nombre de stimuli métaboliques comme les LDL oxydés, les acides gras libres mais aussi l'hypoxie et le stress oxydant (Shi et al. 2006; Barton 2008). Bien que partageant les mêmes voies de signalisation, la réponse inflammatoire induite par ces stimuli métaboliques est une réponse graduée, de faible intensité, qui correspond plutôt à une situation intermédiaire entre l'état basal et une réponse inflammatoire classique : on parle d'inflammation à bas bruit ou de para-inflammation **(Fig.26)**. Il est important de noter qu'indépendamment de la voie des TLR, ces stimuli métaboliques peuvent activer directement les cellules inflammatoires (activation plaquettaire, activation leucocytaire, activation du complément) et que d'autres récepteurs et enzymes intracellulaires peuvent intervenir dans la signalisation inflammatoire (Szmitko *et al.* 2003b). Ces cascades de signalisation ont été majoritairement isolées en se fondant sur des résultats tirés d'études *in vitro*. La hiérarchie, les interactions et la régulation de ces voies de signalisation in vivo restent encore largement méconnus (Medzhitov 2008).

3.1.2. Dysfonction endothéliale et activation endothéliale

L'inflammation à bas bruit **(Fig.26)** est caractérisée par une activation de plusieurs voies de signalisation inflammatoires et une production anormale de médiateurs pro-inflammatoires, synthétisés et sécrétés notamment par l'endothélium. En fonction de la réponse inflammatoire induite, l'endothélium est capable d'adapter progressivement une synthèse et une sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et/ou anti-inflammatoires, des facteurs vasodilatateurs et/ou vasoconstrictants, des molécules matricielles, des facteurs pro-coagulants et anti-thrombotiques, des facteurs de croissance (Constans et Conri 2006). Cette réponse de l'endothélium favorise ainsi le rétablissement de l'homéostasie vasculaire. La dysfonction endothéliale est caractérisée par une altération de la réactivité vasculaire et un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique. Cette dysfonction ou dérégulation aiguë de l'équilibre homéostasique prédispose la paroi vasculaire à l'activation de l'endothélium **(Fig.27)**, phénotype endothélial caractérisé par de l'adhésion leucocytaire, l'activation plaquettaire, de la vasoconstriction et des mécanismes de thrombose et de coagulation (Szmitko *et al.* 2003a; Zhang 2008). Plusieurs points de régulation permettent une dissipation cette activation endothéliale et un retour à un « état basal » (Nathan 2002). Cependant lorsque les stimuli inflammatoires ou métaboliques perdurent ou sont imposés de façon répétée, comme par exemple lors du développement de l'obésité ou du diabète de type 2, on observe une inflammation à bas bruit chronique qui contribue à la progression du processus athérosclérotique (Van Gaal et al. 2006). Ainsi, la dysfonction endothéliale est considérée comme l'étape la plus précoce de l'athérogenèse, participant à l'initiation et au développement de la plaque athérosclérotique et précédant les premières manifestations cliniques athérothrombotiques (Sattar 2004; Grover-Paez et Zavalza-Gomez 2009). Aussi, une évaluation fiable de marqueurs systémiques de la dysfonction endothéliale a-t-elle une utilité clinique.

3.2. Principaux marqueurs inflammatoires associés à de la dysfonction endothéliale

Des concentrations plus élevées en un grand nombre de marqueurs circulants de l'inflammation, tels, des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, sélectine-E) et des

médiateurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques (IL-6, PAI-1, IL1B, IL-8, TNF-α, le facteur de von willebrand et la thrombomoduline) ont été observées chez des sujets atteints de maladies athérothrombotiques et chez des sujets à risque cardiovasculaire, par rapport à des sujets sains (Constans et Conri 2006). L'inflammation a émergé comme un phénomène central dans l'initiation, la progression et le développement de l'athérosclérose.

De nombreuses études prospectives ont démontré que les concentrations plasmatiques en protéine C-réactive ultrasensible (hsCRP), marqueur de l'inflammation à bas bruit, avait une forte valeur pronostique quant à la survenue de pathologies cardiovasculaires (Ridker 2007; Devaraj et al. 2009). Ainsi, indépendamment des facteurs de risque classique cardiovasculaire, une gradation de la survenue d'évènements athérothrombotiques **(Fig.28)** a été observée en fonction des concentrations en hsCRP plasmatique, chez des sujets à risque ou atteints de pathologies cardiovasculaires (Ridker et al. 2002; Ridker et al. 2004). L'augmentation de la hsCRP plasmatique est donc considérée comme un biomarqueur indépendant de risque cardiovasculaire. De manière intéressante, une étude chez des sujets atteints de maladies coronariennes a rapporté que des concentrations élevées en hsCRP étaient étroitement associées à des altérations de la FMD, et qu'un traitement anti-inflammatoire induisant une normalisation des concentrations en hsCRP induisait une normalisation de la FMD (Verma et al. 2002; Devaraj et al. 2003). En effet, cette protéine de phase aiguë, très associée à l'expression d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, semble participer à la dysfonction endothéliale, en modulant également la sécrétion et la synthèse endothéliale **(Fig.29)** de PAI-1 (marqueur pro-thrombotique), d'endothéline-1 (facteur vasoconstrictant) ainsi que d'eNOS (Szmitko *et al.* 2003a). Cependant, bien que liés étroitement à la dysfonction endothéliale, la plupart de ces marqueurs ne sont pas spécifiquement synthétisés par l'endothélium. La CRP est synthétisée par le foie, et un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1B, MCP-1) et facteurs pro-thrombotiques (PAI-1) sont synthétisés et sécrétés non seulement par les leucocytes mais aussi par le tissu adipeux. Il est important de souligner que ces marqueurs circulants ne sont pas strictement des marqueurs de la dysfonction endothéliale mais reflètent plutôt des variations de l'état inflammatoire associé à de la dysfonction endothéliale.

Ainsi le terme de dysfonction endothéliale rend compte d'une combinaison de dérégulations de voies de signalisation complexes, impliquant des interactions étroites entre la paroi vasculaire et les cellules sanguines circulantes, le tissu adipeux et le tissu hépatique. Afin de dégager clairement les voies de signalisation et les mécanismes impliqués dans la

physiopathologie de l'athérosclérose, il convient d'intégrer ces différents marqueurs directs et indirects dans des modèles d'induction de dysfonction endothéliale.

4. FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE ET INDUCTION DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE

Comme mentionné précédemment, tous les facteurs de risque cardiovasculaire connus ont été associés à un ou plusieurs paramètres de dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale et l'établissement du risque cardiovasculaire sont donc des phénomènes multifactoriels, et les mécanismes impliqués dans la présentation précoce de ce phénotype pro-athérogène sont encore largement méconnus (Feletou et Vanhoutte 2006; Le Brocq *et al.* 2008). Si l'hypertension artérielle, le diabète de type 2, les dyslipidémies et le tabagisme ont été clairement identifiés, historiquement, comme des facteurs de risque cardiovasculaire majeurs et indépendants, il est maintenant établi que l'obésité androïde, la sédentarité et des déséquilibres alimentaires - « trop gras, trop sucré et trop salé » **(Fig.30)** sont des facteurs de risque cardiovasculaire prédisposant (Mozaffarian et al. 2008). Dans ce contexte, le concept du syndrome métabolique a été défini comme une combinaison de désordres métaboliques se présentant fréquemment de façon conjointe, caractérisée classiquement d'un point de vue clinique par la présence de trois critères sur les cinq suivants : élévation de la triglycéridémie, glycémie à jeun élevée, cholestérol HDL bas, élévation de la pression artérielle, obésité centrale (Grundy 2007). Par ailleurs, d'autres facteurs tels l'hyperhomocystéinémie, l'augmentation des concentrations plasmatiques de marqueurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques sont actuellement discutés comme facteurs risque cardiovasculaires émergents ou critères associées à une augmentation de risque cardiovasculaire (Andreotti *et al.* 2000; Blake et Ridker 2002; De Bree *et al.* 2002). L'induction génétique ou nutritionnelle d'états pré-pathologiques et de maladies athérothrombotiques sur des modèles expérimentaux a contribué à l'identification de dérégulations métaboliques impliquées dans l'initiation de la dysfonction endothéliale.

4.1. Modèles génétiques de dysfonction endothéliale

L'invalidation de gènes impliqués dans le métabolisme de certains facteurs de risque cardiovasculaire a permis d'établir des modèles animaux développant spontanément de l'athérosclérose. De façon non exhaustive, on peut citer les souris invalidées pour le gène codant pour l'ApoE ou les récepteurs au LDL, largement utilisées pour l'induction d'une dyslipidémie génétique et les souris IRKO, présentant une invalidation des gènes impliqués dans la synthèse des récepteurs de l'insuline, entrainant rapidement une insulino-résistance associée à une dysfonction endothéliale (Kearney et al. 2008). Les rats Zucker gras (déficient pour le gène de la leptine) ou encore les rats SHR (spontanément hypertendu) sont d'autres modèles murins utilisés fréquemment pour l'induction de l'obésité et d'insulino-résistance par de l'hyperlipidémie génétique ou de l'hypertension artérielle (Kim et al. 2006). Bien que ces modèles animaux d'induction génétique permettent d'observer facilement un développement rapide de pathologies cardiovasculaires, il est important de noter que chez l'homme les variations génétiques ne semblent jouer qu'un rôle subalterne dans l'établissement du risque cardiovasculaire par rapport aux autres facteurs de risque. En effet, on considère que plus de 70% des évènements cardiovasculaires, 80% des maladies coronariennes et 90% des cas de diabètes de type 2, sont principalement attribuables à des facteurs de risque environnementaux, modifiables, parmi lesquels les facteurs de risque alimentaires (Stampfer et al. 2000; Hu et al. 2001). Par ailleurs, il a été montré que parmi les facteurs de risque cardiovasculaire modifiables (tabagisme, dyslipidémie, hypertension artérielle, diabète de type 2 et obésité), 90% était modulés ou influencés par l'alimentation (Mozaffarian et al. 2008). Ainsi, afin de mimer cette réalité observée chez l'homme, les modèles animaux d'induction génétiques sont souvent associés à une induction nutritionnelle de risque cardiovasculaire (souris invalidées pour l'ApoE soumis à un apport chronique de graisses saturés et de glucides), amplifiant ainsi l'apparition de la dysfonction endothéliale.

4.2. Modèles d'induction nutritionnelle de dysfonction endothéliale

Une étude d'observation réalisée pendant 4 ans, sur une cohorte de femmes en bonne santé, a démontré que la consommation d'un régime de type occidental (« western diet »), riche en glucides simples, acides gras saturés et acides gras trans, et caractérisé par une haute

densité énergétique, était étroitement associée à de la dysfonction endothéliale, évaluée par des marqueurs pro-inflammatoires (Lopez-Garcia et al. 2004). Ce régime de type occidental a été largement utilisé chez l'animal afin d'induire nutritionnellement une dysfonction endothéliale. En effet, il a été démontré chez le rat, le chien et le lapin qu'une consommation chronique d'un repas riche en acides gras saturés et/ ou en saccharose induisait un phénotype de dysfonction endothéliale : altération de la réactivité vasculaire, diminution de la production biodisponibilité du NO, stress oxydant et inflammation à bas bruit (Roberts et al. 2005; Bourgoin et al. 2008; Knight et al. 2008; Le Brocq et al. 2008). Si une consommation chronique d'un repas riche en cholestérol s'est révélée être très efficace pour induire chez l'animal une dysfonction endothéliale (lapins hypercholestérolémiques), les études chez l'homme n'ont pas démontré de relation étroite entre l'hypercholestérolémie et la dysfonction endothéliale (Larose et Ganz 2004; Ray *et al.* 2006). Cet exemple souligne les limites de certains modèles animaux qui peuvent répondre différemment aux inductions parce que les métabolismes et voies de signalisation sont différents de ceux de l'homme. Ces difficultés à extrapoler chez l'homme des donnés recueillies chez l'animal ont été rencontrées dans d'autres exemples de modèles animaux de dysfonction endothéliale induits nutritionnellement tels que des modèles d'hypertension artérielle induit par une alimentation chronique en chlorure de sodium.

De très nombreuses études chez l'homme et chez l'animal ont démontré que, dès la situation postprandiale, des repas riches en acides gras saturés et/ou en glucides induisaient de la dysfonction endothéliale. Il a été suggéré que c'est par la répétition des évènements postprandiaux indésirables que se constituait progressivement la physiopathologie cardiovasculaire et la présentation chronique des facteurs de risques cardiovasculaires. La caractérisation des mécanismes impliqués dans l'établissement de la dysfonction endothéliale en situation postprandiale est donc une étape nécessaire à la compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose.

B. IMPORTANCE DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHEROSCLEROSE

En 1979, dans un article intitulé « l'athérogenèse : un phénomène postprandial », Zilversmit émettait l'hypothèse qu'un phénotype pro-athérogène étroitement lié à l'hyperlipidémie pouvait apparaitre dès la phase postprandiale, et était très certainement à l'origine du développement de l'athérosclérose (Zilversmit 1979). De nombreuses études ont démontré qu'un repas riche en acides gras et/ ou en glucides induisait une diminution transitoire de la FMD prouvant ainsi l'hypothèse de Zilversmit, en caractérisant le phénotype pro-athérogène comme étant de la dysfonction endothéliale postprandiale. Il est maintenant communément admis que la dysfonction endothéliale observée en situation postprandiale joue un rôle prépondérant dans l'initiation et le développement de l'athérosclérose **(Fig.31)**.

Le repas de charge ou test de provocation hyperlipidique et/ou hyperglucidique s'est révélé être une démarche expérimentale de choix pour analyser l'induction d'une dysfonction endothéliale par l'alimentation. Une étude détaillée de la littérature rapportant une évaluation de la fonction endothéliale par différentes mesures et biomarqueurs chez l'homme et chez l'animal, en situation postprandiale, nous a permis de dénombrer plus d'une centaine d'articles. Nous avons observé une importante hétérogénéité non seulement dans les plans expérimentaux des études mais aussi dans la nature et la quantité des macronutriments constituant les tests de provocation. Afin de mesurer les limites de l'analyse des différents marqueurs associés à de la dysfonction endothéliale postprandiale induite et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, il convient d'examiner avec précision les différents types de test de provocation utilisés. Nous allons, dans un premier temps, nous intéresser à la controverse autour de la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie. La dysfonction endothéliale postprandiale induite par des repas hyperlipidiques, qui a fait l'objet de la majorité des études d'induction, sera abordée dans un deuxième temps.

1. DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE INDUITE PAR UNE HYPERGLYCEMIE

1.1. Hyperglycémie postprandiale et risque cardiovasculaire

Depuis une dizaine d'années, de très nombreuses études épidémiologiques ont démontré que l'hyperglycémie postprandiale **(Fig.32**) était un facteur indépendant de risque cardiovasculaire (Bonora et Muggeo 2001; Ceriello 2003; Ceriello 2008). Ainsi, des études prospectives ont montré que la mesure de l'hyperglycémie observée 1h après un test oral de tolérance au glucose (TOTG) était un bon prédicteur du risque de complications cardiovasculaires chez des sujets diabétiques et/ou atteints de pathologies coronariennes et chez des sujets considérés comme étant à faible risque cardiovasculaire (Giugliano et al. 2008).

En outre, des études d'interventions chez des sujets atteints de diabète de type 2 ont rapporté qu'un traitement spécifique de l'hyperglycémie postprandiale par de l'acarbose, était associé à une réduction du risque de développement et de progression du diabète de type 2, et d'évènements athérothrombotiques (Chiasson et al. 2002; Chiasson et al. 2003; Zeymer et al. 2004). *In vitro,* l'incubation de cellules endothéliales en présence de doses élevées en glucose engendre un stress oxydant et nitrosant, associé à une activation endothéliale (Graier et al. 1999; Otsuka et al. 2005; Piga et al. 2007; Quijano et al. 2007). L'hyperglycémie postprandiale induite par un TOTG est donc considérée comme un paramètre extrêmement pertinent, permettant de détecter de façon précoce une situation de dérégulation métabolique chez des sujets malades, mais permettant également d'identifier un risque cardiovasculaire qui n'est pas objectivable à jeun (The-DECODE-study-group 1999; Ceriello 2003; Cavalot et al. 2006). La dysfonction endothéliale induite a rapidement émergé comme le mécanisme-clé pouvant expliquer l'impact de l'hyperglycémie sur la paroi vasculaire. Cependant, alors qu'une dizaine de travaux ont observé une diminution de la FMD induite par des TOTG chez des sujets atteints de diabète de type 2 et des sujets sains, de nombreuses études n'ont rapporté aucune variation postprandiale de la fonction endothéliale après des TOTG ou des repas hyperglycémiques.

1.2. Dysfonction endothéliale postprandiale induite par une hyperglycémie

Avant de commencer notre analyse, il est intéressant de signaler que la dose standard utilisée lors des TOTG est de 75g de glucose, tel que normalisée par l'OMS en 2001 (Giugliano et al. 2008). Cette dose est particulièrement intéressante puisqu'il a été démontré que l'hyperglycémie observée 2h après un TOTG était étroitement associée à celle observée après un repas standard chez des sujets sains, obèses, insulino-sensibles et atteints de diabète de type 2 (Wolever et al. 1998).

Il a été clairement rapporté que chez des sujets atteints de diabète de type 2, une hyperglycémie postprandiale est associée à une dysfonction endothéliale, caractérisée par une diminution transitoire de la FMD et une augmentation de la 3-NT plasmatique (Ceriello *et al.* 2002b; Ceriello *et al.* 2004). En 1997, l'équipe de Guigliano a montré que l'induction d'une très forte hyperglycémie (~3g/L) chez des sujets sains, provoquait une diminution des fonctions vasculaires, de façon NO-dépendante (Giugliano et al. 1997). D'autres études utilisant aussi des doses élevées de glucose administrées directement en IV ont observé une diminution de la FMD. Cependant, ces études ont fait l'objet de nombreux commentaires critiquant ces hyperglycémies sévères totalement irréalistes (Williams et al. 1998; Beckman et al. 2001; Beckman et al. 2002).

La magistrale étude de Kawano **(Fig.33)** a été la première à démontrer qu'un TOTG standard induisait une diminution très précoce de la FMD chez des sujets sains (observée uniquement 1h après le TOTG). En outre, cette diminution de FMD associée à une augmentation plasmatique de marqueur pro-oxydant, était plus importante et prolongée **(Fig.34)** chez des sujets insulino-sensibles et atteints de diabète de type 2 (Kawano *et al.* 1999; Ceriello *et al.* 2002b). D'autres études ont retrouvé chez les sujets sains, l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante par une charge orale modérée en glucose (Akbari et al. 1998; Title et al. 2000; Ihlemann et al. 2003). Cependant, certains travaux, toujours chez des sujets sains, utilisant les mêmes doses de glucose n'ont pas rapporté d'altérations postprandiales de la fonction endothéliale (Houben et al. 1996; Bagg et al. 2000; Charkoudian et al. 2002; Reed et al. 2004; Siafarikas et al. 2004; Major-Pedersen et al. 2008) . Ces études négatives mettent en lumière deux points particulièrement délicats concernant la dysfonction endothéliale postprandiale induite par l'hyperglycémie chez le sujet sain. Premièrement, la précocité (souvent observée uniquement 1h après le TOTG) et la faible amplitude de la diminution de la FMD la rendent souvent indétectable pour des études qui ont exploré la fonction endotheliale à d'autres moments de la phase postprandiale (2h ou 4h). En outre, une

récente étude a montré qu'en prenant en compte certains facteurs hormonaux de confusion, en particulier l'hyperinsulinémie à jeun, la charge orale modérée en glucose en elle-même n'induisait pas directement une altération de la fonction vasculaire chez des sujets sains (Reed et al. 2004). Ainsi, bien que l'influence de l'insuline, agent potentiellement vasodilatateur, sur la dysfonction endothéliale induite par de très fortes doses ait été écartée (Williams 1997), une controverse existe quant à l'effet de doses modérées de glucose. Des études d'intervention restent à réaliser afin de savoir si le traitement de l'hyperglycémie postprandiale permet de prévenir au moins partiellement la dysfonction endothéliale postprandiale. La dysfonction endothéliale postprandiale induite par une hypertriglycéridémie chez le sujet sain est elle beaucoup moins controversée.

2. REPAS DE CHARGE HYPERLIPIDIQUE ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE

2.1. Hypertriglycéridémie et risque cardiovasculaire

De nombreux travaux ont étudié spécifiquement la pertinence de l'hypertriglycéridémie postprandiale comme facteur de risque cardiovasculaire. Ainsi, des études postprandiales, chez des sujets sains ou à risque cardiovasculaire, ont démontré que l'ingestion de repas riches en acides gras induisait un dérèglement des voies du métabolisme lipidique (augmentation des chylomicrons et des VLDL riches en triglycérides, augmentation des LDL oxydés et diminution des HDL), et des études *in vitro* ont décrit des effets délétères de ces lipoprotéines sur la paroi vasculaire (Karpe 1999). En outre, des lésions carotidiennes sévères ont été associées à une augmentation des triglycérides plasmatiques, mesurée dans la phase postprandiale, mais aussi mesurée à jeun (Gronholdt et al. 1996). Une méta-analyse d'études d'observation a démontré qu'une élévation de 1-mmol/L (89mg/dL) de la triglycéridémie dans une population générale d'hommes et de femmes, correspondait à une augmentation de 17 à 37% de l'incidence de maladies cardiovasculaires (Hokanson et Austin 1996). Cependant, comme les patients hypertriglycéridémiques présentent, très souvent, d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, et au regard de l'extrême variabilité des concentrations en triglycérides plasmatiques observées, il est très délicat d'interpréter les résultats de ces études.

S'il a été montré que l'hyperlipidémie induisait une activation endothéliale marquée par une augmentation de l'état pro-coagulant, à la fin des années 90, l'avènement de l'exploration de la fonction endothéliale par la FMD a marqué un véritable tournant dans la mise en évidence d'une altération des fonctions vasculaires en situation postprandiale.

2.2. Charges pures ou repas mixtes ?

Par souci de simplification, les premières études postprandiales de dysfonction endothéliale ont utilisé des charges pures en lipides sous forme d'émulsions lipidiques du type « Intralipid » ou « liposyn » (Lundman et al. 1997; Steinberg et al. 1997). Même si l'hypertriglycéridémie induite est de forte amplitude, il convient de souligner le caractère artificiel de cette approche au regard du comportement alimentaire humain (Lairon et al. 2007). Ce commentaire peut également s'appliquer aux tests de provocation qui ont utilisé de la crème comme unique ingrédient. En effet, bien que de tels repas de charge aient pour avantage une facilité de préparation reproductible à souhait, l'absence d'autres macronutriments et des glucides en particulier les rend particulièrement irréalistes. Ainsi, les nutritionnistes ont largement contribué à l'utilisation de repas mixtes, comportant des ingrédients source de lipides, glucides et protéines, qui correspondent à un comportement alimentaire plus usuel. La présence de glucides dans les repas est particulièrement indispensable afin de respecter une présentation postprandiale conjointe d'influx de nutriments sur les voies du métabolisme lipidique et glucidique, dans un contexte de contrôle hormonal, notamment de la voie de l'insuline (Karpe 1997; Lairon et al. 2007). En 1997, Karpe suggérait de standardiser la quantité des macronutriments : lipides : 60% de l'énergie totale du repas, glucides : 27%E et protéines : 13%E (Karpe 1997).

Souvent, la quantité en macronutriments administrés est indexée au poids corporel de l'individu. En effet, la distribution corporelle de l'adiposité, le degré d'obésité et l'âge sont autant de facteurs pouvant influencer la réponse postprandiale. Il est également intéressant de noter qu'un examen ou un contrôle des habitudes alimentaires de la période précédant le test de provocation est souvent nécessaire. En effet, il a été montré que la nature et la quantité en macronutriments du repas précédant le test mais aussi des repas quotidiens influençaient grandement la réponse postprandiale induite par un repas hyperlipidique (Fielding et al. 1996; Lairon et al. 2007).

2.3. Quantités en lipides dans les repas de charge hyperlipidique

2.3.1. Doses de lipides utilisées

On peut classer les doses de lipides utilisées lors des études, chez l'homme, de la dysfonction endothéliale en trois catégories. Des doses de 5-15g de lipides correspondent à de faibles doses qui n'induisent pas de variations sensibles des concentrations plasmatiques en triglycérides et sont souvent utilisées comme repas « low-fat meal ». Les doses modérées de 30-80g sont les plus utilisées lors des études postprandiales puisqu'elles induisent une hypertriglycéridémie transitoire avec un pic observé entre 4-6h après l'administration du repas de charge. Enfin, des quantités supérieures à 100g de lipides correspondent à de très fortes doses, qui induisent une hypertriglycéridémie quelque peu exagérée par rapport à des provocations alimentaire usuelles, atteignant un plateau perdurant pendant au moins 8h après l'administration de la charge hyperlipidique (Lairon et al. 2007).
Pour qui souhaite analyser les réponses postprandiales rapportées de différentes études qui ont utilisé différentes doses et natures de nutriments chez des sujets sains, malades ou à risque, avec des valeurs hétérogènes de triglycéridémie à jeun, l'amplitude de l'hypertriglycéridémie induite apparait comme un point de référence permettant d'établir des comparaisons pertinentes. Il est intéressant de souligner que ce sont surtout les doses en lipides qui sont mentionnées dans les articles rapportant ces études de charge. Dans certaines études, il est fréquent de ne pas trouver mention des quantités de protéines et de glucides utilisées. De même, les repas « low-fat » consistant le plus souvent en une simple substitution des lipides par des glucides, sont utilisés et interprétés comme des repas-témoin, alors que ce sont en réalité des repas hyperglucidiques, qui pourraient affecter également la fonction endothéliale.

2.3.1. Quantités de lipides d'un repas hyperlipidique et dysfonction endothéliale postprandiale

Pour plus de clarté, nous nous traiterons ici principalement des études ayant évalué la vasodilatation-dépendante de l'endothélium. Chez des sujets sains ou à risque cardiovasculaire, il a été très fréquemment rapporté que des doses modérées en lipides induisaient une diminution transitoire de la FMD **(Fig.35)** alors qu'aucune variation n'était observée après l'ingestion de faibles doses de lipides (Vogel et al. 1997; Wilmink et al. 1999;

Bae et al. 2001; Gokce et al. 2001; Ng et al. 2001; Padilla et al. 2006; Shimabukuro et al. 2007). Ainsi, en faisant abstraction de la nature des acides gras utilisés, il a été observé qu'une augmentation des concentrations en triglycérides plasmatiques de 60-130% induisait une diminution de la FMD de 40-100% par rapport aux données obtenues avant le test de provocation. Très souvent, une forte corrélation **(Tableau 1)** entre la diminution de FMD et l'hypertriglycéridémie induite a été rapportée (Vogel et al. 1997; Boquist et al. 1999; Marchesi et al. 2000; Raitakari et al. 2000; Bae et al. 2001; Gaenzer et al. 2001). Cependant, quand les tests de provocation utilisaient des doses très élevées en lipides ou des charges lipidiques pures, cette corrélation entre FMD et hypertriglycéridémie était moins forte. Ainsi, les diminutions de la FMD induites par de fortes doses en lipides sont souvent d'une amplitude semblable à celles observées après l'ingestion de doses modérées de lipides.

Au-delà de cette question de quantités de lipides, deux points nous paraissent particulièrement intéressant à soulever : la pertinence de l'hypertriglycéridémie comme un marqueur de l'hyperlipidémie et la signification des rares études n'ayant pas observé d'altération de la réactivité vasculaire après un repas hyperlipidique. Tout d'abord, bien qu'une augmentation des taux plasmatiques en triglycérides ait été observée dans la très grande majorité des études postprandiales, dans certains cas plus rares, l'hypertriglycéridémie ne constituait pas le marqueur le plus approprié de l'hyperlipidémie induite. En effet, certaines études ont rapporté une corrélation entre la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par un repas hyperlipidique et une augmentation des concentrations plasmatiques en acides gras libres (de Kreutzenberg et al. 2000; de Kreutzenberg et al. 2003; Shimabukuro et al. 2007). Ces études soulignent le fait qu'aucun rapport de causalité n'a été établi entre l'hypertriglycéridémie plasmatique et l'altération de la réactivité vasculaire induite par un repas hyperlipidique. Ce fait est illustré par une étude qui n'a observé aucune diminution de la FMD chez des sujets atteints d'hypertriglycéridémie sévères (Chowienczyk et al. 1997).

Par ailleurs, sur les 49 études (que nous avons identifiés) ayant exploré la fonction endothéliale vasculaire après un repas hyperlipidique, 6 études utilisant les mêmes quantités de lipides n'ont rapporté aucune variation postprandiale de la vasodilatation-dépendante de l'endothélium **(Tableau 2)** (Djousse et al. 1999; Gudmundsson et al. 2000; Schillaci et al. 2001; de Roos et al. 2002; Strey et al. 2004; Padilla et al. 2006). La majorité de ces études négatives pourrait s'expliquer par des faibles modifications de la position des ballonnets d'occlusion lors de la mesure de la FMD qui peuvent altérer la justesse de la mesure (Djousse

et al. 1999; de Roos et al. 2002; Padilla et al. 2006). En outre, il faut noter que les études ayant exploré la vasodilatation dépendante de l'endothélium au niveau de la microcirculation, n'ont pas montré d'altération de la fonction endothéliale après un repas hyperlipidique (Gudmundsson et al. 2000; Raitakari et al. 2000). Enfin, l'équipe de Schillaci **(Tableau 2)** a suggéré que le sexe était un facteur qui pouvait influencer l'amplitude de la diminution de FMD induite par un repas hyperlipidique. En effet, en comparant les réponses postprandiales de femmes et d'hommes de même âge, il n'a été observé chez des femmes saines aucune variation de la FMD après un repas hyperlipidique (Schillaci et al. 2001). Si cette observation était confirmée, elle pourrait expliquer une partie de la plus grande résistance des femmes au développement des pathologies coronariennes.

2.4. Modulation de la qualité en macronutriments

2.4.1. Macronutriments utilisés et exposition lipémique

Une première question, très largement abordée, a été de savoir si la nature des acides gras, glucides et protéines du repas de charge hyperlipidique pouvait affecter le métabolisme lipidique, et pouvait affecter la réponse postprandiale induite. Concernant la qualité des acides gras, le degré d'insaturation des acides gras végétaux ne semble pas moduler significativement l'hypertriglycéridémie induite. Ce n'est pas le cas pour les huiles de poisson contenant des acides gras polyinsaturés ω-3 (EPA et DHA), qui induisent, une moindre hypertriglycéridémie postprandiale (Karpe 1997; Karpe 1999). Concernant la nature en glucides, il a été montré que l'utilisation, dans les repas hyperlipidiques, de saccharose et/ou de fructose, mais pas celle de glucose avait un effet potentialisateur sur le métabolisme lipidique, augmentant l'amplitude de l'hypertriglycéridémie induite. Par ailleurs, il n'y a pas de données montrant que la qualité des protéines pouvait affecter la réponse lipidique postprandiale.

2.4.2. Qualité des lipides d'un repas hyperlipidique et dysfonction endothéliale postprandiale

On peut tout d'abord constater que plus la proportion d'acides gras saturés dans le repas hyperlipidique est forte, et plus la diminution de la FMD induite est importante. Ainsi, toute chose étant égale par ailleurs, on peut remarquer que lorsque la quantité d'AGS

(Tableau 3) contenus dans le repas hyperlipidique est doublée, la diminution de FMD induite est deux fois plus importante (Marchesi et al. 2000; Shimabukuro et al. 2007). Selon cette observation, on pourrait supposer que l'autre proportion des lipides contenus dans le repas hyperlipidique constitués d'AGMI et d'AGPI aurait moins tendance à induire une altération postprandiale de la fonction endothéliale. La dizaine d'études ayant testé cette hypothèse a mis en lumière une réalité, un peu plus complexe. En effet, au regard des effets cardioprotecteurs rapportés de la diète méditerranéenne, et en particulier de l'huile d'olive (Katan et al. 1995; Esposito et al. 2004; Knoops et al. 2004), 3 études ont testé l'effet d'un repas hyperlipidique contenant de l'huile d'olive par rapport à de l'huile de palme ou du beurre de karité. De façon contre-intuitive, il a été montré que les repas contenant de l'huile de l'olive induisaient, au contraire, diminution de la FMD similaire, voire plus importante, que celle observée après un repas contenant des AGS (Raitakari et al. 2000; Cortes et al. 2006; Rueda-Clausen et al. 2007; Berry et al. 2008). En outre, l'effet de la modulation en acides gras sur l'inflammation à bas bruit induite par un repas hyperlipidique a été testé, et aucun effet bénéfique de l'huile d'olive sur l'augmentation postprandiale des marqueurs proinflammatoires n'a été observé (Sanders et al. 2001; Tholstrup et al. 2003). Une récente étude chez des sujets hypercholestérolémiques a démontré que de fortes teneurs en acides phénoliques, contenues dans de l'huile de l'olive extra-vierge, induisaient une neutralisation de la diminution postprandiale de la FMD, par rapport à de faibles doses d'acides phénoliques, suggérant plutôt un effet des antioxydants associés plutôt que des acides gras contenus dans l'huile d'olive (Ruano et al. 2005).

Concernant les AGPI à longue chaîne, parallèlement aux effets bénéfiques observés sur l'hypertriglycéridémie, 2 études ont montré chez des sujets sains et atteints de diabète de type 2 que la substitution d'une fraction des AGS d'un repas hyperlipidique par des AGPI ω-3 (EPA et DHA), neutralisait complètement la diminution de la FMD, voire entrainait une amélioration de la réactivité vasculaire (West et al. 2005; Armah et al. 2008). De façon moins directe, l'équipe de Vogel a montré qu'un repas hyperlipidique de type méditerranéen, contenant de l'huile de poisson et des mélanges vitaminiques, induisait une réduction de la diminution de FMD observée (Vogel et al. 2000). Le stress oxydant, les phénomènes d'inflammation à bas bruit qui lui sont associés, ont alors émergé comme les mécanismes principaux impliqués dans la dysfonction endothéliale postprandiale.

3. MECANISMES IMPLIQUES DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE

L'altération postprandiale de la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par un repas hyperlipidique et/ou hyperglucidique est très souvent associée à une augmentation non seulement des concentrations plasmatiques en molécules d'adhésion, cytokines proinflammatoires, mais aussi de certains marqueurs de la production d'espèces réactives de l'oxygène. Nous tenterons de comprendre comment ces phénomènes délétères d'inflammation à bas bruit et de stress oxydant sont étroitement liés à la dysfonction endothéliale postprandiale, qui constitue alors un phénotype pro-athérogène complexe particulièrement déterminant dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

3.1. Inflammation à bas bruit et dysfonction endothéliale postprandiale

Initialement, de très nombreuses études ont démontré que des repas de charge hyperlipidiques induisaient une augmentation postprandiale des concentrations plasmatiques de plusieurs facteurs pro-coagulant tels les facteurs d'activation de la cascade de coagulation FVIIc, FVIIa et le fibrinogène (Sanders et al. 2001; Tholstrup et al. 2003; Poppitt 2005). Bien que ces facteurs de l'hémostase soient reconnus comme des biomarqueurs du risque cardiovasculaire, leur impact sur l'initiation de la dysfonction endothéliale postprandiale n'a pas encore été établi. De façon plus intéressante, une augmentation postprandiale d'autres facteurs pro-coagulants, tel PAI-1, des cytokines proinflammatoires (telles IL-6 et IL-8), et des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), a été observé après des charges hyperlipidiques et glucidiques chez des sujets sains ou à risque cardiovasculaire (Burdge et Calder 2005; Alipour *et al.* 2007).

3.1.1. Marqueurs de l'inflammation à bas bruit postprandiale

La très grande hétérogénéité des marqueurs proinflammatoires explorés en situation postprandiale **(Tableau 4)** rend difficile toute analyse des différentes réponses proinflammatoires postprandiales observées, d'autant plus que les tests de provocation utilisés

sont eux-mêmes hétérogènes (Sanders et al. 2001; Tholstrup et al. 2003; Tripathy et al. 2003; Ferreira et al. 2004; Rubin et al. 2008). Cependant, de façon assez nette, l'équipe de Van Oostrom a rapporté que des repas hyperlipidiques/et ou hyperglucidiques induisaient chez des sujets sains une altération de la FMD, une augmentation postprandiale des concentrations plasmatiques en IL-6 et en IL-8, associée à une augmentation postprandiale du nombre des leucocytes circulants et plus particulièrement du nombre de polynucléaires neutrophiles (van Oostrom *et al.* 2003b). Ainsi, il a été supposé que le recrutement et l'activation des neutrophiles faisaient partie des phénomènes délétères contribuant à la dysfonction endothéliale postprandiale observée. Cette hypothèse a été renforcée par l'observation d'une augmentation postprandiale de l'expression de marqueurs d'activation des leucocytes, impliqués dans l'adhésion à l'endothélium tels CD11B, CD11A et CD62L, induite chez des sujets sains après un repas hyperlipidique (van Oostrom et al. 2004). Cette observation est à mettre en parallèle avec une augmentation postprandiale des concentrations plasmatiques en molécules d'adhésion spécifiques de l'endothélium tels sélectine-E, et VCAM-1, induites chez des sujets sains et des sujets atteints de diabète de type 2 après des repas de charge hyperlipidiques et/ou hyperglucidiques (Ceriello et Motz 2004; Neri *et al.* 2005). Cela signifie que, dès la phase postprandiale, il y aurait une augmentation du nombre de neutrophiles et de leur capacité d'adhésion à l'endothélium qui caractérise ainsi l'état pro-inflammatoire aigu postprandial. D'un point de vue physiopathologique, ces résultats sont d'autant plus intéressants que de nombreuses études ont démontré que l'adhésion des leucocytes, première étape de la migration leucocytaire transendothéliale, était une étape critique, du développement et de la progression de l'athérosclérose (Worthylake et Burridge 2001; Peschel et Niebauer 2003; Galkina et Ley 2007; Weber *et al.* 2008).

En outre, la remarquable étude de Tripathy a rapporté chez des sujets sains, une augmentation postprandiale de l'activation du facteur de transcription NF-κB, au niveau des leucocytes prélevés après l'ingestion d'une charge hyperlipidique, et que cette activation était associée à une augmentation postprandiale du facteur MIF, cytokine pro-inflammatoire secrétée par les leucocytes et les macrophages et impliqué notamment dans l'activation de NF-κB (Tripathy et al. 2003). Cette étude, en utilisant une charge hyperlipidique pure, a démontré que les acides gras pouvaient directement induire une activation des voies de signalisation inflammatoires. Certains travaux suggèrent au contraire que ce sont plutôt les lipoprotéines, considérées comme athérogènes, qui sont susceptibles d'induire une inflammation à bas bruit.

3.1.2. Voies de signalisation impliquées

Bien que l'hypertriglycéridémie soit considérée comme le marqueur principal de l'hyperlipidémie postprandiale induite par un repas hyperlipidique, les triglycérides ne semblent pas directement dotés d'un potentiel athérogène. En effet, il a été montré que la charge hyperlipidique, qui induisait une surproduction de chylomicrons et de leurs remnants, favorisait également la formation de LDL à faibles densités, considérés comme fortement athérogènes (Roche 1999; Maggi et al. 2004). En outre, il a démontré que l'hypertriglycéridémie est associée à une augmentation plasmatique des lipoprotéines riches en triglycérides, ou TGRLs (Williams et al. 2004). Ces TGRLs comprennent principalement les VLDL, les chylomicrons et leurs remnants de différentes tailles, et semblent pouvoir induire directement une activation leucocytaire. En effet, une augmentation de l'expression du marqueur d'adhésion leucocytaire CD11B, au niveau des neutrophiles et des monocytes, a été observée en incubant des leucocytes en présence de doses physiologiques de ces TGRLs, prélevées chez des sujets hypercholestérolémiques (Alipour *et al.* 2008b). Très récemment, deux études *in vitro* ont démontré que l'incubation de cellules endothéliales en cultures (HUVEC et HAEC) en présence de ces TGRL, obtenues pendant la phase postprandiale **(Fig.36)**, induisait une augmentation de l'activation de facteurs de transcription impliqués dans les voies de signalisation inflammatoire, tels NF-κB et CREB, ainsi qu'une augmentation de l'expression de toutes une palette de cytokines proinflammatoires et de molécules d'adhésion vasculaires (Norata *et al.* 2006; Norata et Catapano 2007; Norata *et al.* 2007; Ting *et al.* 2007). Ainsi, il a été suggéré que les TGRL pouvaient interagir directement avec les leucocytes et les cellules endothéliales, et activer les voies de signalisation inflammatoires, induisant ainsi la sécrétion de cytokines, chimiokines et de molécules d'adhésion (Alipour *et al.* 2007; Alipour *et al.* 2008a).

A ce sujet, il nous parait intéressant de mentionner l'hypothèse exposée par Burdge et Calder qui suggèrent que le tissu adipeux, en tant qu'organe endocrine **(Fig.37)** pourrait être une source majeure de cytokines proinflammatoires (Burdge et Calder 2005; Gustafson *et al.* 2007). Cette hypothèse nous apparait séduisante car elle explique notamment le fait que les augmentations postprandiales en cytokines proinflammatoires plasmatiques soient de plus grandes amplitudes chez des sujets obèses que chez des sujets sains (Blackburn et al. 2006), et que l'adiposité ait été récemment étroitement associée à des marqueurs circulants

proinflammatoires chez des enfants en surpoids (Alvarez et al. 2009). En outre, il a été montré que le tissu adipeux était le principal consommateur d'acides gras libres pendant la phase postprandiale (Frayn 2002; Bickerton et al. 2007). On peut donc s'interroger sur le rôle que joue le tissu adipeux dans l'induction d'un état pro-inflammatoire observé lors de la dysfonction endothéliale postprandiale.

Par ailleurs, quelques études ont montré qu'une incubation de cellules endothéliales en cultures présence de fortes doses de glucose induisait aussi une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et de cytokines proinflammatoires (Sampson et al. 2002; Otsuka et al. 2005; Piga et al. 2007). Les mécanismes impliqués dans l'activation des voies de signalisation inflammatoires par l'hyperglycémie n'ont pas encore été élucidés. Cependant, il est intéressant de noter que ces phénomènes proinflammatoires induits par l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie, peuvent être atténués par l'ajout dans le milieu de culture d'antioxydants pharmacologiques ou d'origine alimentaire (Lin et al. 2005). Ces résultats ont été aussi retrouvés in vivo et l'équipe de Nappo a démontré que des augmentations postprandiales d'IL-6, TNF-α et VCAM-1 et ICAM-1 dans le plasma étaient réduites par l'ajout d'antioxydants vitaminiques (Vitamines E et C) aux repas hyperlipidiques et hyperglucidiques. Le stress oxydant semble donc représenter un médiateur clé dans l'initiation de la dysfonction endothéliale postprandiale.

3.2. Stress oxydant et dysfonction endothéliale postprandiale

Le stress oxydant est considéré comme un mécanisme majeur impliqué dans le développement et la progression de l'athérosclérose. De façon très intéressante, dès la phase postprandiale, deux démarches complémentaires ont permis de mettre en évidence une forte contribution de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'établissement de la dysfonction endothéliale induite. Une première approche a consisté en l'évaluation directe de marqueurs circulants de stress oxydant dans la phase postprandiale, permettant ainsi de caractériser différents phénotypes de stress oxydant postprandial. D'autres investigateurs ont plutôt examiné le potentiel de traitements vitaminiques antioxydants à réduire la dysfonction endothéliale postprandiale.

3.2.1. Marqueurs de stress oxydant postprandial

Avant d'aborder l'analyse des différentes études ayant mis en évidence un stress oxydant postprandial, deux points importants sont à souligner. En premier lieu, il convient de rappeler que la notion de stress oxydant implique non seulement la production de ROS par différentes sources exogènes et endogènes, mais aussi les systèmes antioxydants endogènes s'opposant à la rupture de l'homéostasie redox. Pour avoir une indication plus juste du stress oxydant induit, l'observation de 2 systèmes sera souvent nécessaire. En deuxième lieu, les techniques de quantification des systèmes oxydants et antioxydants comportent souvent de sérieuses limites de spécificité et de précision, accentuées par la demi-vie souvent courte des espèces radicalaires. Ainsi, l'utilisation de plusieurs méthodes évaluant le stress oxydant au niveau de plusieurs compartiments cellulaires et tissulaires sera souvent recommandée.

De façon générale, les produits issus de la peroxydation lipidique tels le malondialdéhyde (MDA) et les isoprostanes F-2 sont les marqueurs les plus utilisés pour évaluer le stress oxydant, et se sont révélés être particulièrement approprié à la mesure du stress oxydant dans la situation postprandiale **(Tableau 5)** (Ceriello et al. 1998; Schinkovitz et al. 2001; Tushuizen et al. 2006; Devaraj et al. 2008). En effet, plusieurs études ont observé une augmentation postprandiale des concentrations plasmatiques des TBARS (Index de peroxydation lipidique) chez des sujets atteints de diabète de type 2 mais aussi chez des sujets sains après un repas hyperlipidique (Ceriello et al. 1998; Anderson et al. 2001; Tushuizen et al. 2006; Devaraj et al. 2008). Ces études ont alors émis l'hypothèse que la charge de peroxydes lipidiques contenus dans le repas hyperlipidique pourrait dépasser la capacité de la glutathion-peroxydase gastro-intestinale, lors de l'absorption lipidique, expliquant les peroxydes lipidiques retrouvés dans la circulation. Cette hypothèse semble être en accord avec la diminution des taux plasmatiques de glutathion peroxydase et de la capacité antioxydante totale plasmatique observée après des repas hyperlipidiques, chez des sujets sains (Tsai et al. 2004; Signori et al. 2008; Tyldum et al. 2009). Cependant, étonnamment, une étude a montré que lorsque l'on augmentait les doses de peroxydes lipidiques contenus dans les repas hyperlipidiques (huiles utilisées à plusieurs reprises pour la friture), on amplifiait l'altération postprandiale de la FMD sans modifier les concentrations plasmatiques en TBARS (Williams et al. 1999). En outre, deux autres études n'ont rapporté aucun effet de la qualité des huiles utilisées sur la fonction endothéliale postprandiale (Williams et al. 2001; Rueda-Clausen et al.

2007). Ainsi, nous pouvons émettre de sérieuses réserves quant à la validité de l'hypothèse de la contribution au stress oxydant postprandial, des peroxydes présents dans le repas hyperlipidique.

De façon intéressante, deux études ont montré qu'une augmentation de la production de ROS par les leucocytes était observée lorsque ces derniers étaient prélevés après un repas hyperlipidique (Bae et al. 2001; Tripathy et al. 2003). Au regard de la forte localisation tissulaire et cellulaire des systèmes oxydants et antioxydants (Dikalov et al. 2007), de nombreuses études restent à réaliser afin de savoir comment se caractérise le stress oxydant postprandial au niveau de tissus cibles, et notamment de l'endothélium vasculaire, d'autant plus que plusieurs traitements vitaminiques ont prouvé leur efficacité à limiter la dysfonction endothéliale postprandiale.

3.2.2. Supplémentation d'antioxydants et dysfonction endothéliale postprandiale

L'équipe de Plotnick a été la première à démontrer que l'ingestion de 1g de vitamine C et de 800UI de vitamine E, juste avant l'ingestion d'un repas hyperlipidique, prévenait complètement l'altération de FMD observée après l'ingestion du repas hyperlipidique seul (Plotnick et al. 1997). De plus, il a été montré que la coadministration de ce même mélange vitaminique à un repas hyperlipidique ou hyperglucidique induisait **(Tableau 6)** aussi une réduction de l'expression postprandiale de marqueurs proinflammatoires et de molécules d'adhésion chez des sujets sains et les patients atteints de diabète de type 2 (Nappo et al. 2002). Les vitamines antioxydantes semblent pouvoir exercer un effet protecteur sur plusieurs paramètres de la fonction endothéliale (FMD et inflammation à bas bruit). Cependant, il est intéressant de noter que lorsque les vitamines sont administrées de façon isolée, vitamine E ou vitamine C seules, à des doses équivalentes, les effets protecteurs sur la fonction endothéliale vasculaire semblent plus marqués pour la vitamine C, que pour la vitamine E (Pleiner et al. 2002; Bae et al. 2003; Blendea et al. 2005; Anderson et al. 2006). En outre, cet effet bénéfique des vitamines semble être plus efficace dans le cas de combinaisons vitaminiques, que ce soit lors d'une co-administration avec le repas hyperlipidique ou d'un prétraitement vitaminique sur une période d'une semaine à 1 mois (Bae et al. 2003; Esposito et al. 2003; Anderson et al. 2006). En effet, Plotnick a également rapporté, chez des sujets sains, qu'une supplémentation vitaminique, sur un période de 1 mois et sous forme de jus de fruits associés à des extraits de plantesréduisait l'altération postprandiale de la FMD (Plotnick et al. 2003).

Une autre étude a montré qu'une supplementation à des doses élevées en antioxydants (vitamine C, vitamine E et N-acétylcystéine) pendant une période de 15 jours, réduisait l'augmentation postprandiale de VCAM-1 et vWF chez des sujets atteints de diabète de type 2 (Neri et al. 2005). Notons aussi que l'incubation d'anneaux aortiques, en présence d'antioxydants tels le glutathion (réduit) ou la N-acétylcystéine, supprime la chute de vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par l'addition lipoprotéines remnants (Doi et al. 1999). L'ensemble de ces études suggèrent que le stress oxydant postprandial est le mécanisme explicatif majeur impliqué dans la dysfonction endothéliale postprandiale (Sies et al. 2005).

3.2.3. Stress oxydant postprandial et dégradation oxydative du NO

Des études *in vitro* utilisant des cellules endothéliales en cultures et des anneaux aortiques ont démontré que de fortes doses d'acides gras libres ou de glucose induisaient directement une production de ROS au niveau de l'endothélium et plus particulièrement au niveau mitochondrial (Graier et al. 1999; Inoguchi et al. 2000; Nishikawa et al. 2000; Quijano et al. 2007). De nombreuses hypothèses ont été formulées concernant la nature, les sources de ROS et les cibles impliquées dans l'altération de la fonction vasculaire. Dans notre fenêtre d'étude qu'est la phase postprandiale, l'hypothèse de l'inactivation du NO par les ROS produits et la production de peroxynitrites, nous apparait particulièrement pertinente. En effet, l'équipe de Ceriello a rapporté dans plusieurs études, une augmentation postprandiale de la 3-NT plasmatique (+30%), 2h après l'ingestion de repas hyperlipidiques et/ou de charges glucidiques, chez des sujets sains et des sujets atteints de diabète de type 2 **(Fig.38)**, par rapport aux valeurs observées à jeun (Ceriello *et al.* 2002a; Ceriello *et al.* 2002b; Ceriello *et al.* 2004). Cette augmentation postprandiale de la 3-NT plasmatique ainsi que la diminution de la FMD se retrouvent prolongées, 5h après le repas hyperlipidique, uniquement chez les sujets atteints de diabète de type 2 (Ceriello *et al.* 2002b).

Ce stress nitrosant postprandial suppose une diminution postprandiale de la production/biodisponibilité du NO. En testant que la vasodilatation endothélium-dépendante était principalement NO-dépendante, de nombreuses études ont suggéré qu'une diminution de la production et/ou biodisponibilité du NO était impliquée dans l'altération de fonction endothéliale postprandiale induite par un repas hyperlipidique ou hyperglucidique.

Cependant, pendant la phase postprandiale, le métabolisme du NO n'a été que très peu exploré. Une étude a montré que, chez des sujets atteints de diabète de type 2, une augmentation significative de l'ADMA plasmatique (+140%) était observée 5h après l'ingestion d'un repas hyperlipidique, par rapport un « low fat meal ». Une corrélation entre la diminution de la FMD et l'augmentation de l'ADMA a été rapportée, suggérant une contribution de cet inhibiteur de la NOS à l'altération postprandiale de la fonction endothéliale (Fard et al. 2000). Cependant, chez des sujets sains, aucune variation postprandiale de l'ADMA plasmatique n'a été observée après un repas hyperlipidique (Cortes et al. 2006). Afin de comprendre comment le NO, molécule clé dans l'homéostasie vasculaire, est modulé lors de la dysfonction endothéliale postprandiale, une évaluation d'autres marqueurs de la production et de la biodisponibilité du NO restent à réaliser, pendant la phase postprandiale,

Bien que les mécanismes n'aient pas encore été élucidés, il est communément admis que l'hyperlipidémie et l'hyperglycémie induisent une dysfonction endothéliale via des phénomènes délétères de stress oxydant et d'inflammation à bruit. De façon intéressante, des supplémentations en certains acides aminés jouant un rôle important dans la synthèse du NO ou encore dans l'homéostasie redox pourraient moduler la fonction endothéliale. L'apport protéique pourrait ainsi jouer un rôle dans la modulation nutritionnelle de la fonction endothéliale et pourrait par ailleurs aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'établissement de la dysfonction endothéliale.

C. INTERET D'UN APPORT PROTEIQUE DANS LA MODULATION NUTRITIONNELLE DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE

La littérature sur la modulation de la fonction endothéliale par un apport protéique est principalement centrée sur l'effet de supplémentations en acides aminés ayant un impact potentiel sur les différentes fonctions de l'endothélium. L'arginine, en tant que précurseur du NO, a fait l'objet de nombreuses études chez l'animal et chez l'homme. Ainsi, il a été démontré que des supplémentations chroniques ou aigues en L-arginine à fortes doses avaient un effet bénéfique sur la fonction endothéliale et l'homéostasie redox mesurées chez des sujets malades ou à risque cardiovasculaire (Preli et al. 2002; Loscalzo 2004). Il sera intéressant de comprendre, à quelles doses et par quels mécanismes précis, l'arginine exerce des effets bénéfiques sur les fonctions vasculaires.

En outre, une importante littérature s'est concentrée sur l'impact des acides aminés soufrés sur la fonction endothéliale. Ainsi, des charges en méthionine ont très souvent été utilisées pour l'induction d'hyperhomocytéinémies aigues ou en chroniques, reconnues comme facteur inducteur de dysfonction endothéliale (Andreotti et al. 2000). Au regard du fait que l'hyperhomocystéinémie soit considérée comme un marqueur indépendant de risque cardiovasculaire, la compréhension des mécanismes régissant l'établissement ce phénotype bien particulier de dysfonction endothéliale, s'est révélée tout à fait intéressante. Très récemment, des travaux ont montré que l'altération de l'homéostasie du glutathion était associée à de la dysfonction endothéliale chez le sujet sain, et ont fait émerger l'intérêt de la cystéine, précurseur naturel du glutathion, comme possible modulateur de la fonction endothéliale (Ashfaq et al. 2006).

Par ailleurs, quelques études d'observations ont suggéré un effet bénéfique des protéines végétales, et plus particulièrement des protéines de soja, sur le risque cardiovasculaire. Cependant, les études d'intervention ont été beaucoup moins concluantes (Vega-Lopez et Lichtenstein 2005). Récemment, il a été démontré que l'addition de charges protéiques à un repas hyperlipidique neutralisait la dysfonction endothéliale induite chez des sujets sains (Westphal et al. 2006). Il sera donc intéressant d'analyser avec précision le potentiel d'un apport protéique à moduler la fonction endothéliale et d'évoquer les possibles mécanismes sous-jacents.

1. APPORT EN ACIDES AMINES ET FONCTION ENDOTHELIALE

1.1. Modulation de l'apport en arginine

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

1.1.1. Métabolisme de l'arginine

L'arginine est un acide aminé classé comme conditionnellement indispensable, et est majoritairement issu de la protéolyse. Une fraction du flux total de l'arginine (5 à 20%) est synthétisée à partir de la L-citrulline au niveau rénal. Le facteur limitant de cette synthèse endogène est la biodisponibilité en citrulline, qui est synthétisée au niveau de l'intestin (Wu et Morris 1998; Morris 2004). De récents travaux sur la pharmacocinétique de l'arginine ont montré qu'un apport oral en L-citrulline induisait rapidement une augmentation des concentrations plasmatiques en arginine (Schwedhelm et al. 2008). Très récemment, il a été rapporté, chez des sujets sains, qu'un apport alimentaire en L-Arginine provoquait une augmentation importante et dose-dependante des concentrations plasmatiques de l'arginine ingérée (Mariotti et al. 2009).

On peut distinguer cinq voies de catabolisme **(Fig. 39)** de l'arginine :
1- la protéosynthèse, qui constitue la voie métabolique principale de l'arginine,
2- la synthèse de créatine,
3- la production d'urée et d'ornithine qui est utilisée pour la synthèse des polyamines,
4- la synthèse d'agmatine,
5- la production de citrulline et de NO.
Nous pouvons noter que la citrulline est à la fois un précurseur et un produit de l'arginine. Ainsi, on considère que le cycle arginine-citrulline-arginine permet, notamment, un maintien de l'homéostasie du NO. En outre, il a été montré que les NOS et les argininases, enzymes de production du NO et d'urée, était co-exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire, ce qui

favorise la compétition entre ces 2 voies d'utilisation de l'arginine, les métabolites autorégulant leurs propres voies de synthèse (Wu et Meininger 1993; Mori et Gotoh 2004).

Plusieurs travaux sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de l'arginine ont rapporté que, chez des sujets sains ayant ingéré une dose de 6g d'arginine, la biodisponibilité de l'arginine dans le plasma variait de 40 à 70%, et un pic maximal était observé entre 1h et 1h30 après l'ingestion (Bode-Boger et al. 1998; Gannon et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré qu'une très faible proportion de l'arginine ingérée (environ 1% de la dose) était utilisée comme substrat pour la NOS, donc pour la production du NO (Castillo et al. 1996; Boger et al. 2004), l'extraction splanchnique constituant environ 16% de la production totale du NO (Castillo et al. 1996). Une petite polémique a souflé dans la communauté scientifique concernant la capacité effective d'un apport exogène en arginine à moduler la production du NO (Bode-Boger et al. 2007). En effet, alors que des concentrations plasmatiques de l'arginine sont de l'ordre de 150µM (50-100µM à jeun et 100-250µM en postprandial), des biochimistes ont très tôt montré que le Km de la NOS purifiée était de l'ordre de 3µM (Bredt et Snyder 1990), ce qui suggérait qu'un apport exogène en arginine serait *a priori* inefficace puisqu'à des niveaux normaux de concentrations intracellulaires l'enzyme fonctionnerait déjà à une vitesse maximale. Pourtant, force a été de constater que l'administration d'arginine, à forte dose, chez des sujets à risque ou malades, améliorait les fonctions associées au NO. Ce paradoxe a été baptisé « paradoxe de l'arginine ». La découverte du Km apparent de la NOS qui est plutôt de l'ordre de 73-150µM, tend à clore définitivement cette polémique et ce paradoxe (Boger et Bode-Boger 2001; Bode-Boger *et al.* 2007). Pour certains auteurs, c'est l'ADMA, inhibiteur compétitif de la NOS, qui expliquerait les effets bénéfiques de la supplémentation en arginine, chez des sujets à risque ou atteints de pathologies cardiovasculaires.

1.1.2. Apport en arginine et dysfonction endothéliale

Plusieurs études chez l'homme et l'animal ont montré que des perfusions d'arginine en I.V. induisaient des améliorations des fonctions vasculaires (Gornik et Creager 2004), mais nous nous contenterons de commenter ici les études ayant utilisé des doses orales en L-Arginine. L'équipe de Cooke a été la première à démontrer que, sur un modèle animal d'athérosclérose - des lapins hypercholestérolémiques - une supplémentation en L-arginine

(dans l'eau de boisson), pendant une période de 10 semaines, induisait une amélioration de la fonction endothéliale mesurée ex-vivo **(Fig.40)**, et une réduction de la taille des lésions vasculaires (Cooke et al. 1992). De nombreuses autres études sur le même modèle animal ont confirmé et précisé cet effet bénéfique de l'arginine (Wang *et al.* 1994; Boger *et al.* 1995; Boger *et al.* 1997; Boger *et al.* 1998a). Ainsi, une réduction de la production de ROS et de l'activation endothéliale ainsi qu'une augmentation du ratio Arginine/ADMA, considéré comme un marqueur de la production du NO ont été observées après de supplémentations d'arginine chez l'animal (Preli et al. 2002). Ces résultats ont largement encouragé les études d'intervention chez l'homme.

Contrairement à l'animal, les bénéfices de l'arginine chez l'homme ont été plus discutés (Preli et al. 2002; Loscalzo 2004; Siasos et al. 2007). En effet, de très nombreuses études chez des sujets atteints de maladies athérothrombotiques ou à risque cardiovasculaire, ont rapporté une amélioration de la vasodilatation-dépendante de l'endothélium après une supplémentation en L-arginine, pendant des périodes variant de 3 jours à 1 mois (Clarkson *et al.* 1996; Adams *et al.* 1997b; Lerman *et al.* 1998; Hambrecht *et al.* 2000; Preli *et al.* 2002). Des effets bénéfiques ont été observés aussi bien à de fortes doses en arginine (20 g/j) que pour de plus faibles doses (9g/j). Notons ici que dans une alimentation normale, l'apport en arginine se situe autour de 5g/jour. Comme chez l'animal, d'autres études ont rapporté un effet bénéfique de l'arginine sur les autres paramètres de la dysfonction endothéliale, tels l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1), le GMPc plaquettaire ou le rapport arginine/ADMA (Adams *et al.* 1995; Adams *et al.* 1997a; Chan *et al.* 2000; Preli *et al.* 2002). Très récemment, une méta-analyse a démontré que des supplémentations en arginine, quelque soit la dose, améliorait d'autant plus la FMD que la valeur de FMD mesurée à jeun était basse (Bai et al. 2009).

Cependant, plusieurs études n'ont observé aucun effet bénéfique de l'arginine sur la fonction endothéliale (Preli et al. 2002; Siasos et al. 2007). L'une des premières explications est venue du fait que plusieurs de ces études négatives ont été réalisées chez des sujets sains (Chin-Dusting *et al.* 1996a; Blum *et al.* 2000; Mariotti *et al.* 2007). C'est ainsi qu'il a été supposé que des supplémentations en arginine seraient plus utiles, et donc plus efficaces, chez des sujets manifestant déjà une dysfonction endothéliale. Malgré la plausibilité de cette hypothèse, une très grande réserve concernant la supplémentation en arginine est venue d'une étude montrant une absence d'effet de l'arginine à fortes doses (20g/j pendant 6 mois), observée chez des sujets atteints de maladies coronariennes dont la vasodilatation endothéliale

était altérée (Chin-Dusting *et al.* 1996b). En outre, récemment, une étude d'intervention à grande échelle, chez 153 sujets ayant développé un infarctus du myocarde, a montré qu'un taux de mortalité plus important était observé chez des patients ayant reçu une supplémentation en arginine (9g/j), en même temps que leur traitements post-infarctus, par rapport à de sujets ayant reçu le traitement plus un placebo (Schulman et al. 2006). Cette étude suggère ainsi que, dans certaines situations, l'arginine pourrait au contraire un effet délétère drastique sur la fonction vasculaire. Cet effet délétère de l'arginine a été objectivé sur un modèle animal de souris invalidées pour le gène de l'Apo E. Ainsi, alors qu'aucun effet de l'arginine n'était observé chez des souris ApoE, chez des souris doublement invalidées ApoE/iNOS, une supplémentation en L-arginine, pendant une période de 6 mois, induisait une augmentation des lésions vasculaires **(Fig.41)**, associée à une diminution de la BH_4 vasculaire et à une augmentation des ROS vasculaires et de l'expression vasculaire de nitrotyrosine (Chen et al. 2003). Ainsi, il a été suggéré que, dans certaines situations extrêmement délétères, tels l'infarctus du myocarde, où les concentrations en BH_4 et en arginine seraient très limitantes, la supplémentation en arginine aurait plutôt tendance à amplifier encore davantage le découplage de NOS et le stress nitrosant (Lee et al. 2003). Cette hypothèse reste à confirmer par d'autres études ciblant plus spécifiquement la voie de synthèse du NO lors de supplémentation en L-Arginine, à différents stades de l'athérosclérose.

De façon très intéressante, il a été montré que la supplémentation en L-Arginine à doses alimentaires (6g/j pendant 10j) améliorait l'altération postprandiale de la FMD induite par un repas hyperlipidique (Marchesi et al. 2001). Ce résultat a été confirmé dernièrement en aigu, où l'ingestion d'une dose unique de 15g en arginine **(Fig.42)**, réduisait l'altération postprandiale de la fonction endothéliale et aussi le stress oxydant postprandial (Lin et al. 2008). La situation postprandiale constituerait ainsi, probablement, une dérégulation métabolique plus propice à la manifestation d'un effet bénéfique de l'arginine sur la fonction endothéliale vasculaire.

1.2. Apport en acides aminés soufrés et fonction endothéliale

La méthionine, la cystéine, l'homocystéine et la taurine sont les quatre acides aminés soufrés (majeurs) retrouvés dans l'organisme. Seules la méthionine et la cystéine sont incorporées aux protéines. Un aperçu du métabolisme des acides aminés soufrés va nous

permettre de comprendre comment un apport alimentaire en ces 2 acides aminés protéinogènes conduit à la formation de composés métaboliques pouvant moduler la fonction endothéliale vasculaire (Brosnan et Brosnan 2006; Huneau *et al.* 2008).

1.2.1. Métabolisme des acides aminés soufrés

La méthionine ne peut pas être synthétisée *de novo* et est classé comme un acide aminé comme strictement indispensable. En effet, la présence d'un groupement méthyle thioéther sur la chaine latérale de la méthionine lui confère une forte valeur biologique.

Alors que la protéosynthèse est la voie d'utilisation principale de la méthionine, en fonction des besoins de l'organisme en groupements méthyles, la méthionine libre ou provenant des protéines, est utilisée comme donneur de méthyle et alimente le cycle métabolique de transméthylation/reméthylation (Brosnan et Brosnan 2006; Fukagawa 2006).
Ainsi, la transméthylation **(Fig.43)** convertit la méthionine en homocystéine, via la formation de deux intermédiaires métaboliques, la S-adénosylméthionine (SAM), considérée comme le donneur universel de méthyle pour plus 50 réactions de méthylation, et la S-adénosylhomocystéine (SAH), produit de la déméthylation de la SAM (Mudd et al. 2007). Le rapport SAM/SAH est considéré comme un indicateur de la capacité de méthylation cellulaire (Doshi et al. 2005; Finkelstein 2007). La transméthylation est la voie obligatoire de catabolisme de la méthionine. En fonction des besoins et des apports en méthionine et en cystéine, l'homocystéine produite à partir de la SAH est soit reméthylée en utilisant la voie des folates comme donneur de méthyles, soit transulfurée en cystéine (Selhub 1999). Les vitamines B6 et B12 étant des cofacteurs vitaminiques de plusieurs enzymes impliqués dans le métabolisme des acides aminés soufrés, des déficits en folates ou en vitamines B6 et B12 peuvent entrainer une modulation de l'homocystéine.
A ce stade, notons aussi qu'un apport élevé en méthionine conduit à un déséquilibre du cycle métabolique transméthylation/déméthylation en faveur d'une augmentation de l'homocystéine, qui est alors retrouvée à de fortes concentrations au niveau du plasma. Plusieurs études ont montré qu'un excès en homocystéine pouvait être directement ou indirectement délétère pour l'endothélium vasculaire et une importante littérature s'est constituée à propos du rôle de l'hyperhomocystéinémie en tant que marqueur et/ou potentiel facteur de risque cardiovasculaire (Weiss *et al.* 2001; Selhub 2006; Papatheodorou et Weiss

2007). Il sera donc intéressant de comprendre dans quelle mesure un apport excessif de méthionine peut-être pro-athérogène par l'hyperhomocystéinémie qu'il peut induire.

La transulfuration **(Fig.43)** est la seconde étape de la synthèse de la cystéine à partir de la méthionine. Dans cette étape qui se déroule principalement au niveau du foie et du pancréas, le groupement thiol de la chaine latérale de l'homocystéine est transféré sur une sérine, aboutissant à la formation de cystéine. Près de 60% du flux corporel de cystéine est orienté vers la synthèse de différents métabolites, 40% allant vers la synthèse protéique (Fukagawa et al. 1996; Huneau et al. 2008). La cystéine alimentaire est ainsi majoritairement utilisée pour la synthèse de glutathion. Le glutathion est un tripeptide ubiquitaire (Glu-Cys-Gly) impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires tels la détoxication, le maintien du statut redox et la modulation de la prolifération cellulaire (Lu 2008). Ainsi, le glutathion représente une cible préférentielle par la prévention des altérations vasculaires provoquées par une surproduction de ROS. L'homéostasie du glutathion est finement contrôlée par la biodisponibilité en cystéine et des mécanismes de rétrocontrôle négatif (Lu 2008). De façon intéressante, il a été montré qu'un apport élevé en cystéine libre ou en protéine riches en cystéine, stimule la synthèse de glutathion, dans differentes situations (Mariotti et al. 2004; Stipanuk 2004; Huneau et al. 2008). Nous tenterons également de comprendre comment des apports alimentaires en cystéine sont susceptibles de moduler la dysfonction endothéliale vasculaire.

1.2.2. Apport en méthionine et dysfonction endothéliale

En 1969, Mc Cully suggéra pour la première fois qu'une augmentation des concentrations en homocystéine plasmatique totale pouvait constituer un risque cardiovasculaire. En effet, chez des enfants développant une hyperhomocystinurie génétique sévère, causée par un défaut congénital du gène codant pour la CBS, enzyme impliquée dans la transulfuration, il a été observé des formes prématurées de pathologies athérothrombotiques. Cette pathologie humaine rare a été à la base de l'hypothèse d'une implication de l'homocystéine dans l'athérogenèse (McCully 1969). Par la suite, de nombreuses études épidémiologiques prospectives ont montré chez des sujets à risque cardiovasculaire ou malades qu'une hyperhomocystéinémie, aussi bien à jeun que postprandiale, était associée à un risque de mortalité accrue, de façon indépendante des autres

facteurs de risque cardiovasculaire classique (Durand *et al.* 2001; De Bree *et al.* 2002; Lentz et Haynes 2004; Zylberstein *et al.* 2004; Casas *et al.* 2005).

Initialement, l'utilisation de doses élevées de méthionine en aiguë ou test de charge en méthionine a été développé pour diagnostiquer, chez des sujets hétérozygotes déficients pour la CBS, une hyperhomocystéinémie non détectée par un dosage classique à jeun (Durand et al. 2001). Utilisée chez l'animal, cette surcharge en méthionine chronique, à des doses supranutritionnelles (6-10g soit 300mg/kg), induisant une hyperhomocystéinémie sévère, a été étroitement associée à une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, une augmentation de l'ADMA et de la production systémique et vasculaire de ROS et de l'expression vasculaire d'ICAM-1, NF-κB (Zhang et al. 2004). De façon intéressante, une altération de la FMD a été également observée en aiguë chez l'homme sain, à des doses nutritionnelles (2g). Cette dysfonction endothéliale **(Fig. 44)** étant d'autant plus importante que les doses en méthionine ingérées étaient élevées (Chambers et al. 1999). Plusieurs autres études ont rapporté des altérations de la fonction endothéliale après des charges en méthionine, et cette dysfonction endothéliale induite est souvent utilisée comme modèle d'étude des effets délétères l'hyperhomocystéinémie (Bostom *et al.* 1995; Bellamy *et al.* 1998; de Jong *et al.* 1999; Hanratty *et al.* 2001a). D'un point de vue mécanistique, l'établissement d'un stress oxydant, inactivant la production/biodisponibilité du NO et l'inflammation à bas bruit ont été considérés comme les phénomènes principaux pouvant expliquer l'effet délétère de l'homocystéine sur la fonction vasculaire (Lentz 2005; Dayal et Lentz 2007; Papatheodorou et Weiss 2007).

Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré que l'hyperhomocystéinémie, même modérée, pouvait être considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire (Wald et al. 2002; Casas et al. 2005; Loscalzo 2006; Wald et al. 2006). Afin de tester ce lien potentiel de causalité entre hyperhomocystéinemie modérée et risque cardiovasculaire, des études d'intervention à grande échelle ont été réalisées afin de savoir si une réduction efficace de l'hyperhomocystéinémie par un traitement vitaminique, s'accompagnait d'une réduction du risque cardiovasculaire. Alors que des effets bénéfiques étaient observés chez des sujets manifestant une hyperhomocystinurie congénitale (Yap et al. 2001), chez des sujets dont l'hyperhomocystéinémie était modérée, aucune réduction du risque cardiovasculaire n'a été observée après un traitement de mélange vitaminique réduisant l'hyperhomocystéinémie, et au contraire certains effets indésirables ont été observés (Toole et al. 2004; Bonaa et al. 2006; Lonn et al. 2006; den Heijer et al. 2007; Jamison et al. 2007). Il semblerait donc que nous

n'ayons pas encore tous les éléments pour considérer l'hyperhomocystéinémie comme un véritable facteur de risque cardiovasculaire.

De nombreuses questions se sont alors posées concernant la signification réelle de l'hyperhomocystéinémie expérimentale induite par une surcharge en méthionine (Dayal et al. 2008). De récentes études semblent sérieusement reconsidérer le rôle direct de l'homocystéine sur la fonction endothéliale vasculaire. Est-ce l'homocystéine ou plutôt la méthionine qui est impliquée dans la dysfonction endothéliale induite ? En effet, sur un modèle de souris invalidées pour le gène de l'ApoE, lorsque l'on rajoute des vitamines B à un repas enrichi en méthionine, alors que l'hyperhomocystéinémie est normalisée, une augmentation de la taille des lésions vasculaires est quand même observée (Troen et al. 2003). En outre, sur un modèle de rats hypertendus, il a été rapporté des effets hypotenseurs bénéfiques d'une supplémentation en méthionine sur la pression artérielle associée à une augmentation plasmatique du glutathion réduit (Robin et al. 2004). Au-delà de la question de l'hypermohomocystéinémie, il semble nécessaire de devoir appréhender de façon plus globale l'impact de charge orale en méthionine sur la fonction vasculaire en reconsidérant le cycle métabolique de la méthionine et plus particulièrement sur la synthèse de cystéine et de glutathion (Moat et al. 2001; Parodi et al. 2007).

1.2.3. Cystéine, homéostasie redox et fonction endothéliale

Pour mieux comprendre comment des apports alimentaires en cystéine sont susceptibles de moduler la fonction endothéliale vasculaire via la synthèse de glutathion, il convient de prendre la mesure de la complexité de la signalisation redox dans laquelle sont engagés la cystéine et le glutathion.

Tout d'abord, notons que le glutathion est le principal antioxydant non enzymatique endogène de l'organisme **(Fig.45)**, en raison de sa participation à l'activité catalytique des glutathion peroxydases (enzymes impliquées dans l'élimination des hydroperoxides et peroxides lipidiques), et de sa capacité à capter directement différentes espèces radicalaires. La modulation du statut redox par les propriétés antioxydantes du glutathion constitue souvent l'hypothèse sous-jacente des études de supplémentation en cystéine (Lu 2008).

En outre, par la forte réactivité des groupements thiols présents sur la chaine latérale du glutathion et de la cystéine, ces deux molécules sont présentes dans l'organisme sous deux

formes, les formes disulfures oxydées (glutathion oxydé, GSSG et cystine, CySS) ou les formes réduites (glutathion réduit, GSH et cystéine, Cys). Ces deux couples redox GSH/GSSG et CySS/Cys sont considérés comme de véritables points de contrôle du statut redox (Moriarty-Craige et Jones 2004; Kemp *et al.* 2008). Bien que la biologie des systèmes redox soit à ces balbutiements, les premières évaluations du potentiel d'oxydoréduction des principaux couples redox de l'organisme ont relevé une véritable compartimentation **(Fig.46)** cellulaire et subcellulaire de ces systèmes (Kemp et al. 2008). Au regard des concentrations intracellulaires en glutathion, dans les différents compartiments cellulaires, le couple GSH/GSSG est le principal contributeur du maintien du statut redox au niveau intracellulaire (Schafer et Buettner 2001). Au niveau du plasma où les concentrations en cystéines sont bien plus élevées que celles du glutathion, bien que le potentiel redox du couple Cys/CySS soit plus positif (plus oxydé), de récentes études considèrent le couple Cys/CySS comme étant un contributeur majeur au maintien du statut redox extracellulaire (Moriarty-Craige et Jones 2004). La mise en évidence de perturbations fines du potentiel redox de ces deux couples dans différentes situations à conduit Jones à proposer une redéfinition de la notion de stress oxydant, non plus perçu comme un déséquilibre global entre prooxydants et défenses antioxydantes objectivé par l'apparition de produits terminaux d'oxydation, mais plutôt comme une altération localisée et fine de la signalisation et du contrôle redox (Jones 2006). Récemment, le développement de techniques permettant de détecter très finement les formes oxydées et réduites du glutathion et de la cystéine, a permis d'associer des perturbations du statut redox de ces deux couples à des situations pathologiques ou à risque cardiovasculaire (Townsend et al. 2003).

Lorsque l'on induit une déplétion en glutathion réduit par une inhibition de la synthèse du glutathion chez des rats sains, l'oxydation du glutathion objectivée par une diminution systémique et vasculaire du ratio GSH/GSSG, est associée à une diminution de la réactivité vasculaire mesurée *ex vivo* (Ganafa et al. 2002). Chez l'homme, de faibles concentrations plasmatiques de cystéines totales (formes réduites plus formes oxydées) ont été associées à la présence de pathologies vasculaires périphériques ou cérébrales (El-Khairy et al. 2001), mais pas à un risque accru de mortalité (El-Khairy et al. 2003). Récemment, dans un modèle murin de syndrome métabolique (des rats sous régime hypersaccharosé pendant 6 semaines), il a été observé une altération du statut redox du glutathion, marquée par un potentiel redox du couple GSH/GSSG devenant plus positif (ç-à-d plus oxydé), au niveau hépatique et systémique (Blouet *et al.* 2007a). En outre, l'équipe d'Ashfaq a rapporté, chez des sujets sains ne

manifestant aucun symptôme clinique de pathologie cardiovasculaire, que le ratio GSH/GSSG **(Fig.47)** était associé de façon indépendante à une augmentation de l'épaisseur media-intima carotidienne (Ashfaq et al. 2006). Cette étude a été la première à suggérer que le statut redox GSH/GSSG pouvait être un marqueur prédictif de situations pré-pathologiques athérothrombotiques. Très récemment, la même équipe a montré que, parmi les formes oxydées et réduites du glutathion et de la cystéine présentes au niveau plasmatique, seuls la cystine et son disulfure mixte **(Fig.48)** étaient associés, de façon indépendante, à une altération de la FMD chez des sujets sains (Ashfaq et al. 2008). Ainsi, de nombreuses études restent à réaliser afin de comprendre comment des altérations du métabolisme et du statut redox du glutathion et de la cystéine sont impliquées dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

Les connaissances sur la pharmacocinétique de la cystéine et le métabolisme du glutathion étant assez récentes, peu d'études ont, à ce jour, examiné l'effet d'apport nutritionnel en cystéine sur le métabolisme du glutathion et sur la fonction endothéliale vasculaire. D'une part, en 2000, il a été montré chez des sujets sains qu'un apport nutritionnel en acides aminés soufrés (cystéine, 26 mg/kg) pendant 10 jours modulait à court terme la synthèse et le renouvellement du glutathion, par rapport à un repas déplété en acides aminés soufrés (Lyons et al. 2000). Notons à ce stade que l'apport en cystéine a été estimé dans la population nord-américaine à hauteur de 1,3g/j chez les hommes (Huneau et al. 2008). D'autre part, il a été démontré qu'une perfusion intra-artérielle de 500mg de glutathion réduit (GSH) diminuait l'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, chez des sujets atteints de pathologies vasculaires (Prasad et al. 1999). En outre, il a été rapporté qu'une supplémentation orale en un donneur de cystéine, la N-acétylcystéine (NAC, 1.2g/j pendant 1mois), augmentait le taux plasmatique de glutathion réduit (GSH) et réduisait les concentrations plasmatiques en glutathion oxydé (GSSG) et en VCAM-1 chez des sujets atteints de diabète de type 2 (De Mattia et al. 1998).

On peut alors supposer qu'un apport en cystéine pourrait réduire des altérations de la fonction vasculaire. Trois études chez l'animal ont rapporté qu'un apport en NAC était capable de moduler la production du NO. Tout d'abord, il a été montré qu'une supplementation supra-nutritionnelle en NAC (1,5g/kg/j) pendant 8 semaines normalisait la diminution de l'expression de la NOS observée sur un modèle de rats diabétiques (Xia et al. 2006). De la même façon, une supplementation de 20 g/l de NAC dans l'eau de boisson pendant 8 semaines induisait une augmentation de l'expression et de l'activité vasculaire

d'eNOS **(Fig.49)** chez des rats hypertendus (Pechanova et al. 2006). Par ailleurs, il a été proposé que le glutathion pourrait favoriser le recyclage de la BH_4, cofacteur de la NOS, augmentant ainsi sa biodisponibilité et activer ainsi la production du NO (Forstermann et Munzel 2006). Il est intéressant de signaler ici que la cystéine et le glutathion peuvent directement réagir avec le NO, produisant alors de la nitrosocystéine et du nitrosoglutathion. Bien que ces nitrosothiols semblent contribuer à la vasodilatation dépendante de l'endothélium, les voies de signalisation et le rôle exact de ces composés restent méconnus (Rassaf *et al.* 2002a).

De façon intéressante, l'étude de Blouet et collaborateurs a démontré que des protéines solubles du lait **(Fig.50)**, enrichies en α-lactalbumine (riche en cystéine 2g/kg de protéine) étaient aussi efficaces que des doses équivalentes de NAC à réduire l'augmentation plasmatique de 3-Nitrotyrosine protéique induite par un repas hypersaccharosé (Blouet *et al.* 2007b). Bien que d'autres études restent à réaliser, cette dernière étude souligne l'intérêt d'observer des effets des acides aminés soufrés sur la fonction vasculaire via un apport protéique.

2. APPORT PROTEIQUE ET FONCTION ENDOTHELIALE

Bien que les effets de modulations de l'apport alimentaire protéique sur les fonctions vasculaires aient été très peu étudiés, nous examinerons ici si des modifications de la quantité ou de la qualité des protéines d'un repas ou d'un régime sont susceptibles de moduler la fonction endothéliale.

2.1. Variations quantitatives en protéines et fonction endothéliale

Tout d'abord, les études ayant évalué la fonction vasculaire après une diminution de l'apport protéique sont plutôt en faveur d'un effet délétère de la restriction protéique sur l'endothélium. En effet, il a été montré, chez des rats femelles gestantes, qu'un régime hypoprotéique (8% de caséine), pendant 18 jours, induisait une diminution de la réactivité vasculaire (évaluée *ex vivo* au niveau d'artères mésentériques), par rapport à celle mesurée chez des rats ayant ingéré un repas isocalorique normoprotéique (18% de caséine) (Koumentaki et al. 2002). Comme cette diminution de la réactivité vasculaire était

principalement NO-dépendante, il a été supposé que la restriction protéique induisait un déficit en arginine, provoquant alors une diminution de la production ou de la biodisponibilité du NO. Cette hypothèse reste à démontrer puisque des régimes pauvres en arginine, induisant des diminutions de concentrations plasmatiques en arginine, n'ont pas provoqué de modification de la production de NO (Castillo et al. 1995). De façon intéressante, après la restriction protéique, cette dysfonction endothéliale a été observée non seulement chez les femelles gestantes mais aussi au niveau de leur progéniture (Itoh *et al.* 2002; Torrens *et al.* 2003; Hanson et Gluckman 2005).

D'autre part, une seule étude a évalué, directement, les effets d'une augmentation de l'apport protéique sur la fonction endothéliale. Cette étude de Ferrara et collaborateurs ne montre aucun effet sur la FMD, d'un régime hyperprotéique (30%) pendant 8 semaines, chez des sujets sains (Ferrara et al. 2006). Par ailleurs, bien que plusieurs études aient suggéré que des régimes hyperprotéiques induisaient un stress oxydant via des oxydations mitochondriales observées au niveau hépatique (Remesy et al. 1988), d'autres études ont montré qu'un régime hyperprotéique (50%E) pendant des périodes de 15j à 6 mois, ne semble pas affecter les marqueurs systémiques et hépatiques de stress oxydant, chez des sujets sains (Petzke et al. 2000). En outre, si certaines études ont rapporté que des régimes hyperprotéiques peuvent avoir aussi un effet anti-inflammatoire, notamment chez des sujets obèses, probablement par un effet de l'arginine sur le NO (Bowen et al. 2003; Archer et al. 2008), une autre étude chez des sujets atteints de pathologies athérothrombotiques a montré qu'une augmentation de la CRP plasmatique était associée à une consommation élevée en protéines (Fleming 2000). L'ensemble de ces travaux suggère que tester la modulation de quantité de protéines sans porter attention à la nature des protéines et à la composition en acides aminés ne permet pas d'établir de conclusions sur l'effet de l'apport protéique sur la fonction endothéliale vasculaire.

2.2. Qualité des protéines alimentaires et dysfonction endothéliale

Dans un contexte où les bienfaits d'une alimentation riche en produits végétaux sur le risque cardiovasculaire sont reconnus, il est intéressant de savoir si les protéines végétales modulent la fonction endothéliale vasculaire.

La principale protéine végétale à avoir été étudiée est la protéine de soja. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que des consommations élevées en produits à base de soja, étaient retrouvées dans la population asiatique et associées à des effets favorables sur le métabolisme lipidique, par un effet hypocholestérolémiant notamment (Anthony 2000; Torres et al. 2006). Cependant, les matières protéique à base de soja contiennent des quantités importantes en phyto-estrogènes, les isoflavones (1-4mg/g), et on peut se demander quels sont rigoureusement les effets des protéines de soja *per se* (représentant 35-40% du poids sec des graines de soja (Xiao 2008). En effet, une très importante littérature s'est constituée afin de déterminer l'intérêt des isoflavones dans le cadre du traitement hormonal substitutif chez les femmes ménopausées et à corriger les troubles associées à la ménopause (Clarkson 2002). De façon plus spécifique, peu de travaux se sont intéressés à l'effet des isolés protéiques de soja sur la fonction vasculaire. Une étude a montré que la substitution des protéines de lait par des protéines de soja, contenant 80mg d'isoflavones, ingérés pendant 4 semaines, induisait une réduction de l'altération de la FMD observée chez des femmes postménopausés hypercholestérolémiques (Cuevas et al. 2003). En outre, il a été rapporté que l'ingestion d'un régime contenant des protéines de soja et des isoflavones, pendant 6 semaines, avait un effet bénéfique sur la réactivité vasculaire postischémique (Steinberg et al. 2003). Cependant, , aucun effet sur la FMD n'a été rapporté après l'ingestion pendant 6 semaines d'isolés protéiques de soja provenant de différentes sources (lait, farine ou graines de soja) chez des sujets hypercholestérolémiques (Matthan et al. 2007). Bien que d'autres restent à réaliser, ces études semblent suggérer que l'effet bénéfique du soja pourrait principalement provenir de son contenu en isoflavones qui, indépendamment des protéines de soja, pourrait directement moduler la fonction vasculaire via l'expression de eNOS (Anthony *et al.* 1998; Si et Liu 2008).

Par ailleurs, d'autres protéines végétales ont attiré l'attention de certaines équipes, notamment en raison de leur richesse en arginine et/ou en acides aminés soufrés. Ainsi, il a été montré que l'ingestion de repas contenant des isolés protéiques de lupin, pendant 2 semaines, normalisait l'altération de la réactivité vasculaire observée chez des rats diabétiques (Pilvi et al. 2006). De plus, une réduction de l'installation de l'insulino-résistance, chez des rats soumis à un régime riche en acides gras saturés et en saccharose, a été observée lorsque les protéines de lait du régime étaient remplacées par des protéines de colza (Mariotti *et al.* 2008). Cependant, aucune étude n'a encore testé l'effet spécifique du contenu en acides aminés de la fraction protéique d'un repas sur les fonctions endothéliales vasculaires.

CONCLUSION ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX

De façon manifeste, la dysfonction endothéliale postprandiale constitue un phénotype pro-athérogène primordial dans la physiopathologie de l'athérosclérose (de Koning et Rabelink 2002; Davignon et Ganz 2004; Le Brocq *et al.* 2008). Au regard des différentes études chez l'homme et chez l'animal, les phénomènes de stress oxydant et d'inflammation à bas bruit apparaissent comme les principaux mécanismes impliqués dans l'apparition des évènements postprandiaux indésirables, caractérisant la dysfonction endothéliale (Poppitt *et al.* 2004; Burdge et Calder 2005; Sies *et al.* 2005). Cependant, bien que le NO soit une molécule clé dans l'homéostasie vasculaire (Yetik-Anacak et Catravas 2006), en raison d'obstacles méthodologiques, l'implication d'altération de différents marqueurs de la production/biodisponibilité du NO dans l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale restent encore méconnue. Par ailleurs, bien que le tissu adipeux soit une source majeure de cytokines proinflammatoires (Frayn 2002; Burdge et Calder 2005), à notre connaissance, aucune étude n'a examiné l'implication cet organe endocrine dans l'induction d'un état pro-inflammatoire observé lors de la dysfonction endothéliale postprandiale.
Aussi, avons-nous cherché, dans un premier temps, à caractériser, chez le rat sain, au niveau physiologique et métabolique, la dysfonction endothéliale induite par un repas riche en acides gras saturés et riche en saccharose, afin d'examiner ces deux processus physiopathologiques inexplorés :
- la présence d'altération de la voie de signalisation Arginine-NO (production et biodisponibilité du NO) en situation postprandiale, associé à un défaut de vasodilatation-dépendante de l'endothélium
- l'existence d'une induction proinflammatoire précoce dans le tissu adipeux viscéral et sa place dans la réponse proinflammatoire systémique.

Dans un deuxième temps, au regard de l'effet bénéfique de supplémentations nutritionnelles en arginine sur la dysfonction endothéliale postprandiale (Preli et al. 2002; Loscalzo 2004), et du potentiel de la cystéine à moduler l'homéostasie redox (Lyons et al. 2000; Huneau et al. 2008), nous avons formulé l'hypothèse qu'un apport en protéines

naturellement riches en arginine et en cystéine pouvait prévenir l'apparition de la dysfonction endothéliale pendant la phase postprandiale. Ainsi, en disposant des différents paramètres caractérisés de la dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain, nous avons cherché à mettre en évidence l'effet d'une modulation de la nature en protéines d'un repas riche en acides gras saturés sur la fonction endothéliale vasculaire pendant la phase postprandiale.

Un peu en marge de l'ensemble de ce travail, nous nous sommes également intéressés à une autre modulation de la fonction endothéliale vasculaire par des acides aminés, la dysfonction endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie aiguë, provoquée par une surcharge en méthionine. En effet, de nombreuses études chez l'Homme et chez l'animal ont démontré que l'induction d'une hyperhomocystéinémie modérée provoquait une altération de la réactivité vasculaire (Bellamy *et al.* 1998; Chambers *et al.* 1999; Hanratty *et al.* 2001b). Chez l'Homme, le modèle unique d'hyperhomocystéinémie expérimentale repose sur l'administration d'une charge orale en méthionine, mais on connait mal les mécanismes d'initiation de la dysfonction endothéliale. Ainsi, on ne sait pas si les mécanismes qui président à la dysfonction endothéliale dans ce modèle sont conformes (ou compatibles) à certaines hypothèses physiopathologiques développées dans la littérature. Nous avons donc cherché à comprendre comment certains marqueurs associés au métabolisme de la méthionine et d'autres marqueurs associés à la synthèse du NO peuvent être impliqués dans l'initiation de la dysfonction endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie modérée provoquée par une surcharge en méthionine chez le rat sain.

ELEMENTS DE CHOIX METHODOLOGIQUES

L'objectif de ce dernier volet introductif est d'exposer de façon concise les différentes orientations méthodologiques vers lesquelles nous nous sommes dirigées, tout au long de ce travail de thèse.

1. Caractérisation de la dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain

1.1. Nécessité de développer une méthode d'exploration fonctionnelle de l'endothélium chez le rat vigile

Afin d'effectuer des mesures répétées de la fonction endothéliale vasculaire pendant la phase postprandiale chez le rat sain, il nous a d'abord fallu développer un test de réactivité vasculaire chez le rat vigile nous permettant de discriminer une altération postprandiale de la vasodilatation dépendante de l'endothélium après un repas de charge, qui est largement décrite dans la littérature chez l'Homme.

Pour des raisons historiques, nous avons choisi l'acétylcholine comme substance vasodilatatrice. Ainsi, notre méthode d'évaluation de la réactivité vasculaire a consisté en la mesure de la chute de pression artérielle transitoire induite par l'administration intraveineuse d'acétylcholine. La pression artérielle chez le rat vigile a été mesurée par pléthysmographie d'occlusion au niveau de la queue, méthode très précise qui a été validée chez l'animal par la très prestigieuse « American Heart Association » (Feng et al. 2008). De nombreuses séances d'habituation ont été réalisées afin de supprimer la composante naturelle de stress de l'animal induit par l'évaluation des paramètres hémodynamiques de la fonction endothéliale (contention, cathétérisation de la veine latérale caudale et mesure de pression artérielle par pléthysmographie).

Historiquement, nous avions choisi, dans le laboratoire, la souche consanguine normotendue (Wistar-Kyoto), comme souche de rat, témoin, lors d'expériences réalisées sur des souches de rats hypertendus SHR. Des expériences préliminaires ont établi que la mesure d'une reactivité vasculaire à l'acetylcholine était possible chez ce rat, et par la suite, nous avons ainsi trouvé judicieux le choix de cette souche consanguine, qui a l'avantage d'une bonne sensibilité aux facteurs environnementaux. Ainsi, une souche consanguine semble la plus appropriée pour la

mise en évidence de phénomènes métaboliques et hémodynamiques très fins et très précoces (dysfonction endothéliale postprandiale, altération de la production/disponibilité du NO).

1.2. Choix du repas de charge « high-fat meal »

Notre principal objectif en élaborant le test de charge hyperlipidique était de disposer d'un repas suffisamment délétère qui nous permettrait de visualiser les dérégulations métaboliques attendues tout en gardant une vraisemblance nutritionnelle. Au regard de la littérature, il nous est apparu évident que la richesse en acides gras saturés du repas nous donnait la garantie d'induire des effets délétères postprandiaux. C'est pour cela que nous avons choisi un test de charge hyperlipidique contenant 60% de l'énergie sous forme d'huile de palme. La présence de glucides et de protéines a donné un caractère mixte à notre repas, respectant une présentation postprandiale tout à fait conforme à un comportement alimentaire usuel. De plus, les 20% de glucides contenu dans le repas hyperlipidique sont essentiellement du saccharose, dont l'effet potentialisateur sur le métabolisme lipidique a été démontré. A ce titre, on peut considérer que notre test de charge, à la fois riche en acides gras saturés et en saccharose, est doublement délétère. En outre, la nature et les quantités des protéines utilisées (les protéines de lait, une matière protéique de référence) ont été raisonné afin d'examiner par la suite l'effet de la modulation de la nature des protéines du test de charge sur les fonctions endothéliales vasculaires.
Par ailleurs, il est intéressant de noter que notre repas de charge correspond à un apport énergétique de 25kcal, ce qui, rapporté à la consommation énergétique quotidienne, équivaut à un apport de 820kcal chez l'homme. Cependant, comme le rat fractionne son apport alimentaire sur la journée, cet apport en aigu correspond à une plus importante provocation métabolique que cela ne l'est chez l'Homme. Au final, on peut considérer qu'un tel repas de charge est assez comparable à ceux utilisés chez l'Homme (800-1200kcal).

En outre, notre réflexion a abouti à l'utilisation de charge en eau comme témoin afin de vérifier l'influence de variations circadiennes ou d'artéfacts expérimentaux potentiels sur les paramètres de fonctions endothéliales mesurées.
Bien que l'on puisse spontanément se demander dans quelles mesures les effets délétères observés après un repas hyperlipidique sont significatifs par rapport un repas mimant le comportement alimentaire humain avec une distribution en macronutriments « normale » (apport énergétique en glucides : 50%, lipides : 30% et protéines : 20%), nous avons écarté la

possibilité d'utiliser ce repas « normal » comme repas témoin. Comme nous l'avons vu précédemment, de très nombreuses études chez l'homme ont démontré que l'ingestion d'un repas hyperlipidique induisait une altération des fonctions endothéliales, et ce de façon significative par rapport à des repas dits « normaux ». Ainsi, notre objectif n'était pas de démontrer à nouveau que l'induction de la dysfonction endothéliale postprandiale était spécifiquement attribuable au niveau de lipides (et de saccharose) chez le rat sain, mais plutôt d'apprécier la cinétique d'apparition d'une dysfonction endothéliale dans des conditions délétères postprandiales avérées afin d'étudier certains mécanismes sous-jacents et la possible modulation par la fraction protéique.

1.3. Choix des paramètres de la dysfonction endothéliale à caractériser

Au-delà du test de la réactivité vasculaire, nous nous sommes intéressés à caractériser les deux phénomènes associés à la dysfonction endothéliale : le stress oxydant et l'inflammation à bas bruit. Concernant le stress oxydant postprandial, nous avons choisi des marqueurs plasmatiques, facilement mesurables, tels que les hydroperoxydes, l'ORAC, précisé par la suite par un dosage de l'acide urique. Une évaluation de la production d'anions superoxyde au niveau de l'aorte abdominale est venue compléter ces estimations du stress oxydant systémique. Concernant les marqueurs d'inflammation à bas bruit, nous nous sommes cantonnés à une évaluation postprandiale des cytokines proinflammatoires au niveau plasmatique, complétée par une mesure de l'activation leucocytaire.
Ces différents paramètres de dysfonction endothéliale postprandiale déjà décrits dans la littérature ont été confrontés à d'autres marqueurs plus spécifiques de voies de signalisation du NO et de voies inflammatoires au niveau du tissu adipeux.
Par ailleurs, cette caractérisation nous a servi de modèle afin d'observer l'effet de la modulation de la nature des protéines du test de charge.

2. Modulation de la nature des protéines d'un repas hyperlipidique sur la dysfonction endothéliale postprandiale, pourquoi les protéines de colza ?

Historiquement, les protéines de colza ont retenu l'attention de notre groupe en raison de leur richesse en acides aminés indispensables. En outre, si on les compare avec d'autres

protéines végétales **(Tableau 7)**, les protéines de colza sont particulièrement riches en arginine et en cystéine. Très récemment, notre groupe a démontré qu'à long terme les protéines de colza réduisaient l'installation de l'insulino-résistance chez des rats soumis à un régime gras et sucré (Cf. article en annexe). Au regard de nombreuses études ayant démontré le potentiel de supplementation en ces deux acides aminés à doses pharmacologiques et à doses nutritionnelles à prévenir ou à réduire l'apparition de la dysfonction endothéliale, nous avions alors formé l'hypothèse que les effets bénéfiques des protéines de colza pourraient provenir de leur forte teneur en arginine et en cystéine.

Ainsi, dans cette deuxième partie de la thèse, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle les protéines de colza, riches en arginine et en cystéine, pourrait moduler l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale, caractérisée par la triade constituée par l'altération de la réactivité vasculaire, le stress oxydant et l'inflammation à bas bruit. Afin de déterminer si les ces deux acides aminés pouvait expliquer l'éventuel effet positif des protéines de colza, nous avons comparé l'effet d'une substitution des protéines de lait par des protéines de colza, à l'effet d'une supplémentation des protéines de lait en arginine et en cystéine à hauteur des teneurs naturellement apportées par des protéines de colza.

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION D'UN MODELE DE DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE CHEZ LE RAT SAIN

Article 1: Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats

Nitric Oxide, 2009 Aug;21(1):37-43

Joëlle Magné, Jean François Huneau, Stéphanie Delemasure, Luc Rochette, Daniel Tomé et François Mariotti

Introduction et objectifs

Chez des sujets sains, de nombreuses études ont démontré que des repas riches en acides gras saturés induisaient une dysfonction endothéliale postprandiale caractérisée par une diminution de la réactivité vasculaire (Gaenzer et al. 2001; Jackson et al. 2007) associée à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Thomas et al. 2003; Sies et al. 2005; Devaraj et al. 2008). Bien que cette altération postprandiale de la vasodilatation dépendante de l'endothélium implique théoriquement quelque altération de la production et/ou de la biodisponibilité du NO, au moins au niveau local et en situation de stimulation (Cannon 1998; Maxwell 2002; Hare et Stamler 2005), les modulations de la voie de signalisation L-arginine/NO pendant la phase postprandiale restent largement méconnues. S'agit-il d'une altération postprandiale de la production et/ou de la biodisponibilité du NO ? Au regard de l'importance du NO en tant que médiateur majeur de l'homéostasie vasculaire (Davignon et Ganz 2004; Moncada et Higgs 2006), nous avons cherché, dans un premier temps, à caractériser l'apparition de la dysfonction endothéliale, chez le rat sain, après un repas riche en acides gras saturés, en utilisant des paramètres de réactivité vasculaire et des marqueurs de stress oxydant, afin d'examiner, dans un second temps, la production corporelle basale de NO et la biodisponibilité du NO au niveau systémique.

Matériels et méthodes

Un total de 28 rats wistar-kyoto (9 semaines), préalablement habitués aux différentes conditions expérimentales (manipulation, contention, cathétérisation de la veine latérale

caudale et mesure de pression artérielle par pléthysmographie), a été utilisé lors de trois études.

Une étude pilote a consisté au développement du test de réactivité vasculaire, par l'etablissement de réponse selon les doses d'acétylcholine et l'importance du NO dans cette réponse, évaluée par l'effet d'un prétraitement au L-NAME, inhibiteur de la NOS.

Lors d'une seconde étude, nous avons effectué des tests de réactivité vasculaire avant, puis 2, 4 et 6h après le test de charge hyperlipidique (n=10) ou la charge en eau (n=6), ainsi que des prélèvements sanguins afin de mesurer les concentrations en triglycérides, glucose, hydroperoxydes, groupements thiols protéiques, GMPc plasmatiques.

Une dernière étude a consisté en l'évaluation 4h après le repas de charge hyperlipidique (n=12) ou la charge en eau (n=12) de la production corporelle basale du NO par la mesure de l'excrétion urinaire des nitrates ^{15}N après injection intraveineuse d'une dose traceuse d'arginine marquée ([$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine). Afin d'augmenter la puissance statistique, cette dernière étude a été réalisée en dispositif croisé, chaque rat étant son propre témoin et recevant le repas de charge hyperlipidique et le charge-témoin à un intervalle d'au moins une semaine. Enfin, le sacrifice des animaux a été réalisé 6 h après les deux tests expérimentaux afin de prélever l'aorte abdominale pour y évaluer la production vasculaire d'anions superoxyde.

Résultats et Discussion

Comme attendu, l'ingestion d'un repas de charge hyperlipidique a induit une diminution significative de la réactivité vasculaire, étroitement corrélée à l'hypertriglycéridémie postprandiale. L'observation d'une augmentation postprandiale des hydroperoxydes plasmatiques, associées à une augmentation de la production vasculaire d'anions superoxydes, confirme le fait que le stress oxydant soit considéré comme un phénomène majeur dans l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale (Harrison 1997; Maxwell 2002; Munzel et al. 2005). Dans ce contexte, cet article démontre pour la première fois en une situation postprandiale, une diminution de la production corporelle basale du NO, évaluée par une technique très spécifique. En outre, la diminution postprandiale des concentrations plasmatiques en GMPc peut être interprétée ici, comme une diminution de la biodisponibilité du NO, dans la mesure où des variations minimes des concentrations plasmatiques en ANP (Carvajal et al. 2000) ont été observées après le repas de charge hyperlipidique. Cette dernière observation indique que la diminution postprandiale de

la production corporelle basale du NO pourrait probablement se traduire par une diminution de la biodisponibilité du NO. Cette approche intégrée de la dysfonction endothéliale postprandiale sur animal vigile suggère que des dérèglements vasculaires, fonctionnels à bas bruit sont traduits par des modulations systémiques au niveau des voies de signalisation du NO, molécule-signal, régulant plusieurs fonctions cellulaires (Charakida et al. 2006; Jobgen et al. 2006). D'autres études restent à réaliser afin de comprendre l'impact de cette altération de production du NO dans l'établissement de la dysfonction endothéliale postprandiale.

Nitric Oxide 21 (2009) 37–43

Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox

Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats

Joëlle Magné [a,b], Jean François Huneau [a,b], Stéphanie Delemasure [c], Luc Rochette [c], Daniel Tomé [a,b], François Mariotti [a,b,*]

[a] AgroParisTech, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France
[b] INRA, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France.
[c] Laboratory of Experimental Cardiovascular Pathophysiology and Pharmacology, Faculties of Medicine and Pharmacy, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 December 2008
Revised 6 April 2009
Available online 3 May 2009

Keywords:
Endothelial dysfunction
Postprandial state
Oxidative stress
Nitric oxide

ABSTRACT

In healthy humans, a high-saturated-fat/high-sucrose meal induces vascular endothelial dysfunction, a hallmark of atherogenesis. This transient dysfunction indicates a loss in nitric oxide (NO) production and/or bioactivity in the vasculature but it remains unknown if this is the local manifestation of a general impairment in NO pathway in the postprandial state. Here, we studied whole-body NO production and systemic NO bioactivity in postprandial endothelial dysfunction, as induced by a high-saturated-fat, high-sucrose meal.

We first developed a physiological test of endothelial function on conscious rats, based on the transient fall in blood pressure after iv acetylcholine, and showed that this response was NO-dependent. As assessed with this method in healthy rats, endothelial function decreased during the postprandial state, being 60 ± 7% lower than baseline at 6 h after the meal challenge, associated with important elevations in plasma triglycerides and hydroperoxides. Aortic superoxide anion production, as assessed by oxidative fluorescent detection, was higher 6 h after the meal challenge than after the nutrients vehicle (water). During the postprandial period, plasma cGMP, but not plasma ANP, markedly decreased, indicating a general decrease in NO bioavailability, which was numerically maximal 4 h after the meal challenge. As determined 4 h after ingestion by a tracer-based method using iv [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine, the whole-body NO production fell by 27 ± 9% postprandially.

This is the first study evidencing that a meal challenge that impairs the stimulated, NO-mediated, vascular response also reduces whole-body basal NO production and bioavailability. Postprandial pathophysiology may build on this general, fundamental alteration in NO production.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The alteration in vascular endothelial function is the key event in the pathophysiology of atherosclerosis [1]. Epidemiological studies have closely related cardiovascular disease risk with impairment of endothelial function [2], and showed that endothelial dysfunction precedes and predicts atherosclerosis [3]. In these studies, endothelial function has mainly been tested on a physiological ground as vascular reactivity, and this response is considered to be principally due to a transient stimulation in the production of nitric oxide (NO), the critical modulator of vascular homeostasis [1,4–6]. Indeed, the impairment in NO production and/or bioactivity is largely reported as a central feature associated with vascular diseases such as coronary artery disease, stroke, hypertension and diabetes [7–9]. However, there is a lack of direct information regarding whether the NO pathway per se can be altered acutely in vivo, such as in the postprandial state, and thereby play a pivotal role in the earliest initiation stages of atherosclerosis [10,11].

In healthy humans, alterations in vascular endothelial function, as assessed by different methods and markers, including post-ischemic (endothelium-dependent) vascular reactivity, have been repeatedly reported in the postprandial period after the ingestion of high-saturated-fat/high-sucrose meals [12,13]. Indeed, there is a series of evidences that a high-saturated-fat/high-sucrose meal acutely promotes a complex proatherogenic phenotype [5,14,15].

Abbreviations: Ach, acetylcholine; ANP, atrial natriuretic peptide; cGMP, cyclic GMP; DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenyindole; DHE, dihydroethidium; L-NAME, L-N^G-nitro-arginine methyl ester; MAP, mean arterial pressure; NO, nitric oxide; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Address: INRA—AgroParisTech, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France. Fax: +33 1 44 08 18 58.
E-mail address: francois.mariotti@agroparistech.fr (F. Mariotti).

1089-8603/$ - see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.niox.2009.04.003

Increase in reactive oxygen species (ROS) generation after a meal challenge may play a critical role in the onset of postprandial endothelial dysfunction [16–18], most probably because oxidative stress may impair NO production and/or increase NO degradation [19,20].

However, it is still uncertain whether, and to what extent, the arginine/NO pathway (NO production) and/or NO bioactivity are impaired in the postprandial setting. Interestingly, beyond the impact on vascular function, a systemic impact of high-saturated-fat, high-sucrose meal on NO production and/or bioactivity could mediate many metabolic/physiological postprandial adverse effects [21]. Therefore, the objective of this study was to examine whether a meal challenge eliciting postprandial endothelial dysfunction induces a general, basal alteration in NO production and bioactivity.

In the present study, we used the high-saturated-fat, high-sucrose meal as the meal challenge that would be (the most) expected to induce postprandial adverse effects. However, to definitely rule out any role of the circadian variations or potential experimental artifacts on the measurements, and specifically ascribe the effects to the postprandial period, we controlled all measurements with the meal nutrients vehicle, i.e. a small water load. Because there was no appropriate tool for the non-invasive assessment of endothelial function on conscious animals, we first developed, on conscious rats, a hemodynamic test of endothelial function that would exhibit a clear NO-dependence and could therefore be used to monitor the impairment of NO-dependent vascular reactivity in the postprandial state. Using this test, we could document the expected postprandial endothelial dysfunction in this rat model. We then examined systemic and vascular features of oxidative stress.

Once this postprandial situation of acute metabolic and physiological dysregulations was characterized, we could address the objective of this study by investigating systemic NO production and bioactivity, and eventually reveal that this postprandial state is characterized by an impairment in whole-body NO production.

Methods

Animals

Male Wistar–Kyoto rats (9 weeks old, Harlan, France) were housed four per cage in a temperature-regulated room (22 ± 2 °C) on a 12:12 h light/dark cycle, with free access to tap water and standard rat chow. A total of 28 rats were used in a series of studies reported here.

The study protocol was approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethics Committee and all procedures were performed in accordance with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee.

Study design

During 3 weeks before postprandial studies, 16 rats were accustomed to the experimental conditions including handling, gastric gavage, restraining and vascular reactivity testing as described below.

The meal challenge consisted in a 5-mL emulsion made of palm oil, sucrose, milk protein and 2.5 mL water. The energy nutrient content of the meal was (% total energy, 25 kcal) 60% lipids, 20% carbohydrates and 20% protein. This lipid level has been reported to be necessary for eliciting a series of acute postprandial pathophysiological dysregulations [22]. Because all carbohydrates were given as sucrose, at a level of 20%, the meal was also relatively high in sucrose. A 2.5 mL water load alone (i.e. the nutrients vehicle) was used as a control to ascertain whether circadian variations and experimental conditions due to handling, gavage and blood sampling do not affect the postprandial measurements. The meal and nutrients vehicle were administered by gavage.

All tests began after a 12-h fast. An indwelling catheter, filled with heparinized 2% NaCl (50 U/mL), was inserted into a lateral tail vein to allow frequent blood sampling and injection with minimal discomfort for the conscious animal. Venous blood was sampled and vascular reactivity was tested before, 2, 4 and 6 h after the meal challenge ($n = 10$) or the nutrients vehicle ($n = 6$), as described below. Fresh whole-blood was used immediately for determination of blood glucose. All other blood samples were drawn into sodium EDTA or heparinized pre-chilled tubes and were centrifuged for 5 min at 3500*g* at 4 °C. Plasma was stored at −80 °C for further determinations (as described below).

Twelve additional rats, only briefly accustomed to gavage, were used for one dedicated experiment. These rats were killed 6 h after the meal challenge ($n = 6$) or the nutrients vehicle ($n = 6$) and the abdominal aorta was embedded on OCT (Dako, France) and cut into 10-μm-thick sections for oxidative fluorescent detection. The sections were stored at −80 °C.

Lastly, before or 4 h after the meal challenge or the nutrients vehicle, a 5 mg/kg body wt of [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl was injected into a lateral tail vein, and urine was collected over 14 h in glass tubes containing antibiotics for the determination of whole-body NO production, as described below. This experiment was realized following a cross-over design, each of the 12 rats receiving the meal challenge and 2 weeks after the nutrients vehicle. Because the half-life of labeled arginine in plasma is very short [23], the measurement after the iv administration at 4 h evaluates the whole-body NO production at the end of the postprandial period (i.e. approximately in the 4 h–4h:30 min time frame). A 14 h urine collection is required to recover virtually all the nitrate originating from the utilization of labeled arginine for NO synthesis at ~4 h after meal.

Vascular reactivity test

In a quiet and temperature-controlled room (26 ± 2 °C), systolic and diastolic blood pressures were measured in conscious rats by volume–pressure recordings with a plethysmographic sensor and an automated tail-cuff system (XBP1000, Kent Scientific), a specific, very accurate, validated method [24]. After 10 min of adaptation to inflation and deflation of the occlusion cuff in the restrainer, the mean arterial pressure (MAP), calculated as 1/3 systolic plus 2/3 diastolic blood pressure, was derived from an average of 10 consecutive blood pressure recordings per rat.

Then, vascular reactivity was determined as the transient fall in MAP response as recorded in the 5 s after the iv administration of an acetylcholine chloride (Ach) bolus. Vascular reactivity was expressed as the relative fall in blood pressure ((MAP measured immediately after Ach injection—MAP measured before Ach injection)/MAP measured before Ach injection) × 100. The dose response to Ach (0–20 μg/kg) was examined and results were used to select two effective doses of Ach to be used thereafter (10 and 20 μg/kg). To establish the contribution of NO to vascular reactivity during this test, the response to a 20 μg/kg bolus of Ach was measured before and 8 min after pre-treatment with a bolus iv dose of L-N^G-nitro-arginine methyl ester (L-NAME, 100 mg/kg).

Finally, the test was used for studying postprandial endothelial dysfunction after ingestion of the meal challenge or the nutrients vehicle. For each preprandial and postprandial (2 h, 4 h and 6 h) determination of vascular reactivity on each rat, the vascular reactivity was calculated as the average response to three consecutive iv administration of Ach bolus, separated by a minimum of 5 min

between each injection, and reported as Ach-induced %-changes in MAP.

Biochemical analysis

Plasma triglycerides concentrations were determined using an enzymatic method (TG PAP150, Biomerieux) and glucose concentrations were measured in whole-blood by refractometry (Glucometer, Roche Diagnostics).

Plasma oxidative stress markers

The hydrogen peroxide concentration was determined in heparinized plasma by a Ferric ions Oxidation in Xylenol orange (FOX) in-house assay [25]. The plasma oxygen radical absorbance capacity (ORAC) was determined using a fluorimetric assay [26]. Uric acid concentrations were determined in heparinized plasma by enzymatic methods (AUPAP150, Biomerieux). Protein SH groups were assayed in plasma using the method described by Hu [27].

Plasma cyclic GMP

To prevent the breakdown of cyclic GMP (cGMP) by phosphodiesterases activities, heparinized plasma was added immediately after separation with 3-isobutyl-1-methylxanthine (10 mM, 30 μL/500 μL plasma). The cGMP and atrial natriuretic peptide (ANP) concentrations were measured using EIA kits (Assay Designs and SPIbio, respectively).

Vascular oxidative fluorescent detection

Vascular oxidative stress was evaluated by dihydroethidium (DHE)/4′,6-diamidino-2-phenyindole (DAPI) double staining in aortic sections as reported in details by Oudot et al. [28]. Basically, DHE is cell permeable and reacts with $O_2^{-\cdot}$ to form ethidine, which in turn intercalates with DNA, producing a nuclear fluorescence. The number of nuclei per section was determined by DAPI staining. The fluorescent images of aortic sections were acquired with a fluorescent microscope (Eclipse 600, Nikon) connected to a video camera (Tri CCD, Sony). The results were expressed as the ethidine fluorescence/nucleus.

Assessment of whole-body NO production

Whole-body NO production was measured as the relative recovery of ^{15}N as urinary nitrate following the intravenous administration of [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine (Cambridge Isotope Lab), based on a method described by Forte et al. [29], and as reported in detail elsewhere [30]. We determined the ^{15}N enrichment in urinary nitrate as previously described [31]. Briefly, urinary nitrate was first extracted on a highly selective ion-exchange resin (IMAC HP-555, Rohm&Hass) and eluted with NaCl (25%) before conversion into ammonia, using the microdiffusion method [32]. Briefly, the 10 mL eluate was transferred to a glass bottle, and combined with 800 mg KCl, 50 mL Tween 20, 400 mg Devarda's alloy, and 200 mg MgO. The solution was then sealed with a suspended 6 mm filter paper disk saturated with 10 mL $KHSO_4$ (2.5 mol/L), and incubated for 7 days at 65 °C. The disks were then combusted in an Elemental Analyzer, coupled with an Isotope Ratio Mass Spectrometer (Micromass). Background contamination was determined with serial blanks and enrichments corrected using the nitrogen levels in samples and blanks as determined by the Elemental Analyzer. The linearity of the method ($R^2 = 0.995$) was checked using urine spiked with $^{15}NO_3$. Urinary creatinine and nitrate concentrations were measured using a colorimetric (Biomerieux) and fluorimetric method [33], respectively. To determine whole-body NO production, the amount of ^{15}N nitrate recovered from 14-h urine was calculated, corrected for the excretion of creatinine, and expressed as ‰ of the amount of ^{15}N administered as [$^{15}N_2$]-arginine, as follows: $(Q.E)/(d.C)$, where Q and C are the total amounts of nitrate and creatinine excreted in urine, E the ^{15}N enrichment (as atom percent excess) in urinary nitrate and d the amount of ^{15}N injected as [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine. Whole-body NO production was expressed as changes after the challenge meal vs. control values (nutrients vehicle), each rat serving as it own control for baseline or postprandial measurements.

Statistical analysis

Data were expressed as means ± SEM. When the outcomes were repeated (over time and/or meal types), data were analyzed using mixed model procedures for repeated measurements under SAS (SAS Institute), with meal and time used as fixed effects and interaction between the two being tested. When a fixed effect was significant, post-hoc testing was performed under the mixed model with the Tukey–Kramer adjustment. A value of $P < 0.05$ was determined to be statistically significant.

Results

Vascular reactivity test

The administration of Ach (Fig. 1) significantly ($P < 0.0001$) induced a dose-dependent transient decrease in MAP. Baseline MAP was 107.7 ± 2 mm Hg, and the decrease was 11 ± 2% ($P < 0.05$), 17 ± 2% ($P < 0.001$) and 23 ± 3% ($P < 0.0001$) as compared with baseline, after doses of 10, 15 and 20 μg/kg, respectively. The response to Ach (20 μg/kg) was inhibited by 79 ± 10% ($P < 0.05$) by the pre-treatment with L-NAME.

Postprandial triglycerides and vascular reactivity

Baseline systolic and diastolic blood pressure, which were 114.6 ± 2.0 and 116.6 ± 1.6 mm Hg preprandially (for meal challenge and nutrients vehicle groups, respectively; NS) remained

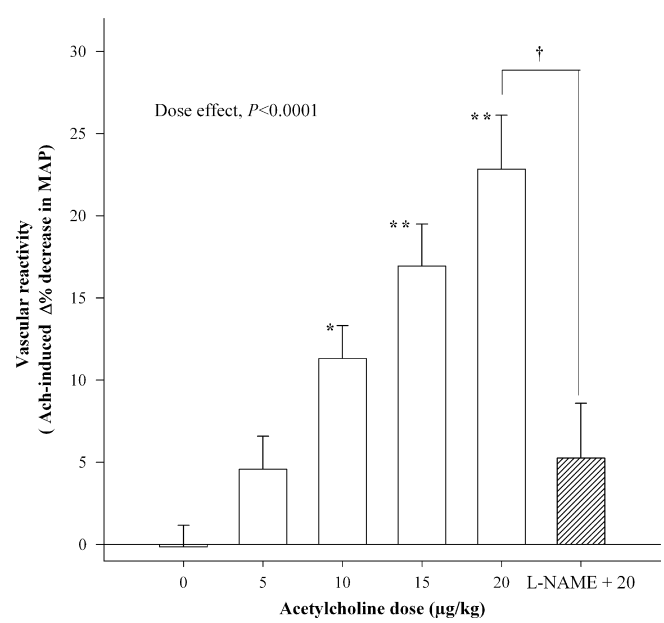


Fig. 1. Vascular reactivity, assessed as acetylcholine (Ach)-induced fall in MAP tested after incremental doses of Ach, and inhibition after pre-treatment with L-NAME. Values are means ± SEM, from $n = 7$ rats. $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.001$ vs. response to vehicle administration (0 μg/kg Ach). $^{\dagger}P < 0.05$ vs. vascular reactivity assessed with 20 μg/kg Ach.

steady during the postprandial period (data not shown). As assessed with the 10 μg/kg (data not shown) or the 20 μg/kg Ach dose (Fig. 2A), the meal challenge induced a postprandial decrease in vascular reactivity. Six hours after ingestion, this decrease was of 60 ± 6% as compared to the baseline value ($P < 0.05$). Mean plasma triglycerides (Fig. 2B) steadily increased, being twice (199 ± 13%, $P < 0.001$) the baseline values 6 h after ingestion of the meal challenge. There was a highly significant correlation ($R^2 = 0.997$; $P < 0.001$) between the increase in mean plasma triglycerides and the decrease in vascular reactivity (data not shown). Blood glucose did not vary significantly over time during the postprandial study (data not shown).

Oxidative stress markers

When compared to the values found after the nutrients vehicle, plasma hydroperoxides (Fig. 3A) progressively increased, up to 136 ± 35% 6 h after the meal challenge as compared to baseline. Aortic superoxide anion production, expressed as ethidine fluorescence related to cellular densities (Fig. 3C), was 125 ± 30% significantly higher 6 h after the meal challenge than after the nutrients vehicle. Plasma uric acid (Table 1) steadily increased by 211 ± 56%, 6 h after the meal challenge as compared to baseline ($P < 0.001$). Plasma ORAC (Table 1) tended to increase ($P = 0.07$) after the meal challenge. Plasma protein SH groups (data not shown) did not vary significantly over time during the postprandial study (data not shown).

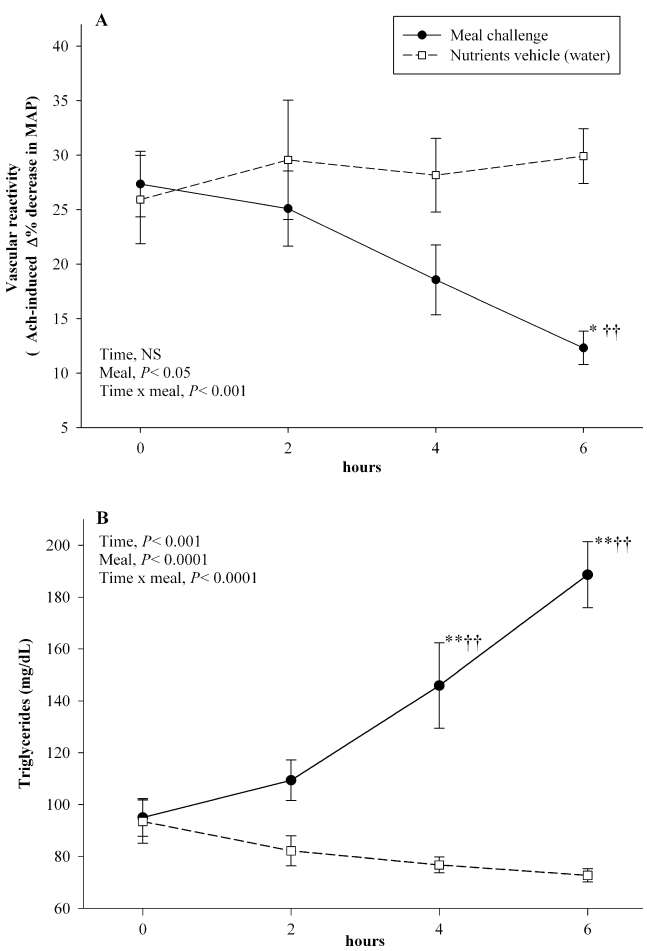


Fig. 2. Vascular reactivity and plasma triglycerides in the postprandial state. (A) Vascular reactivity, assessed as transient fall in MAP after the administration of 20 μg/kg Ach and (B) plasma triglycerides, before and after ingestion of the meal challenge or nutrients vehicle (water). Values are means ± SEM (meal challenge: $n = 10$; nutrients vehicle: $n = 6$). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.001$ vs. baseline, $^{††}P < 0.001$ vs. nutrients vehicle.

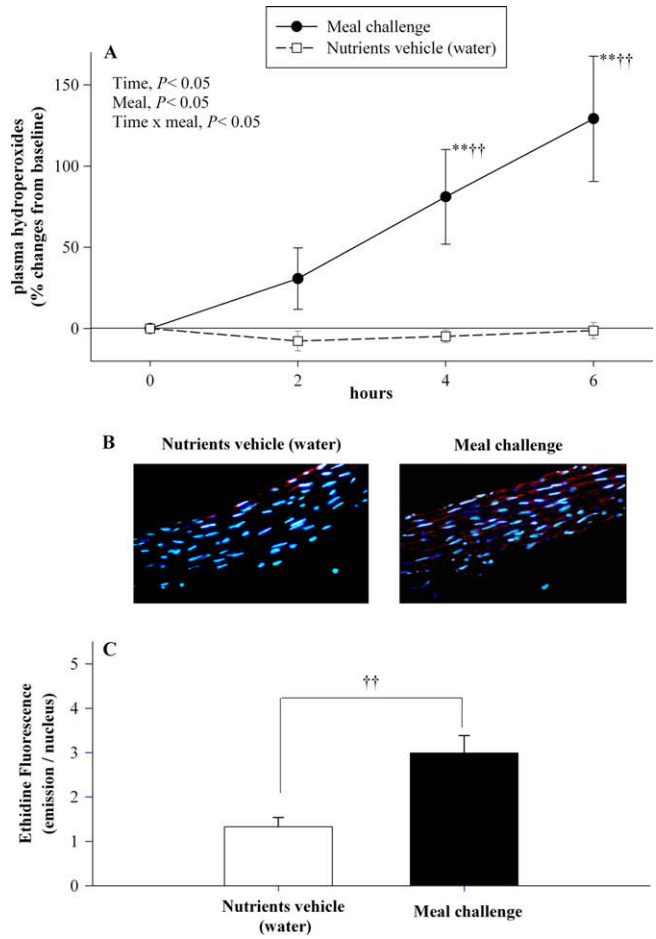


Fig. 3. Systemic and vascular oxidative stress in the postprandial state. (A) Plasma hydroperoxides before and after ingestion of the meal challenge or the nutrients vehicle (water). Values are means ± SEM (meal challenge: $n = 10$; nutrients vehicle: $n = 6$). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.001$ vs. baseline, $^{††}P < 0.001$ vs. nutrients vehicle. (B) Typical aortic DAPI/DHE double staining in aortic section (magnification 400×) sampled 6 h after the meal or vehicle. Red ethidine fluorescence detected superoxide anions production and blue DAPI fluorescence detected nuclei. (C) Ethidine fluorescence quantification 6 h after the meal challenge or the nutrients vehicle. Values are means ± SEM (meal challenge: $n = 6$; nutrients vehicle: $n = 6$). $^{††}P < 0.001$ vs. nutrients vehicle. (For interpretation of color mentioned in this figure legend the reader is referred to the web version of the article.)

NO production and bioavailability

Before meal, cGMP was 3.8 ± 0.5 and 2.9 ± 0.3 pmol/mL (for the meal challenge and the nutrients vehicle groups, respectively; NS). The meal induced a marked and sustained decrease in plasma cGMP (Fig. 4A), with a minimum value reaching one-third (34 ± 8%, $P < 0.001$) the baseline value, 4 h after the meal challenge. It is of note that because there was no statistical differences in cGMP within the 2 h, 4 h and 6 h time points, we cannot conclude that the shape of the postprandial decrease in cGMP is at variance with those of the other variables here studied (e.g. triglycerides, vascular reactivity). Over the postprandial period, plasma ANP (Fig. 4B) was slightly (6 ± 2%) but significantly lower after the meal challenge than after the nutrients vehicle, although postprandial changes did not reach significance (time × meal interaction, NS). This suggests that the decrease in plasma cGMP after the meal

Table 1
Postprandial changes in plasma markers of antioxidant status after ingestion of the meal challenge or the nutrients vehicle (water).

	2 h	4 h	6 h	Time effect	Meal effect	Meal–time interaction
ORAC (% changes from baseline)						
Nutrients vehicle (water)	−4.2 ± 6.4	−2.0 ± 3.9	0.1 ± 5.9	0.3980	0.0775	0.3552
Meal challenge	6.9 ± 5.7	4.0 ± 4.4	14.8 ± 6.7[†,*]			
Uric acid (% changes from baseline)						
Nutrients vehicle (water)	−10.6 ± 6.3	−16.5 ± 8.4	−2.6 ± 3.1	0.0044	0.0067	0.0047
Meal challenge	31.8 ± 11.3	108.9 ± 36.6[††,**]	211.0 ± 56.1[††,**]			

Values are means ± SEM ($n = 10$).
[*] $P < 0.05$ vs. baseline.
[**] $P < 0.001$ vs. baseline.
[†] $P < 0.05$ vs. nutrients vehicle.
[††] $P < 0.001$ vs. nutrients vehicle.

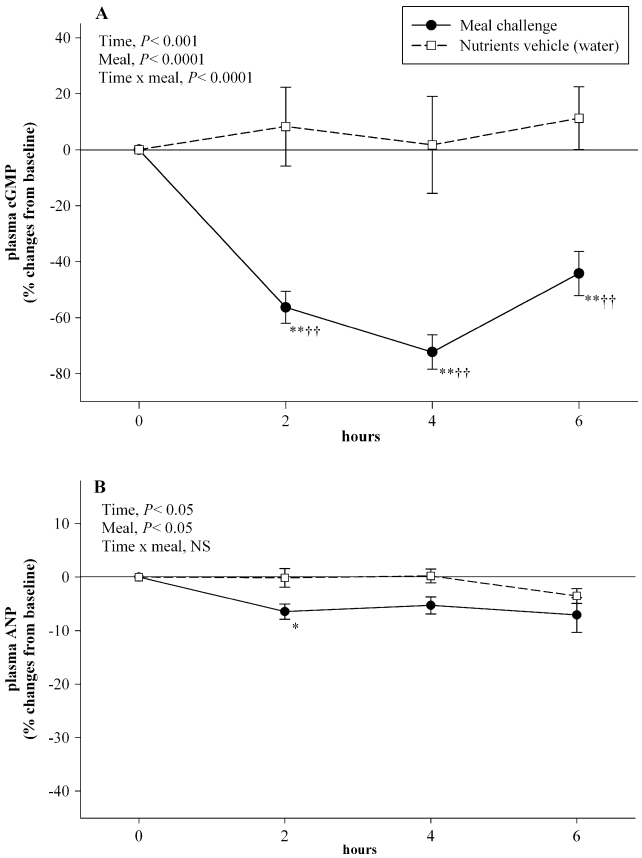


Fig. 4. (A) Plasma cGMP and (B) ANP before and after ingestion of the meal challenge or nutrients vehicle (water). Values are means ± SEM (meal challenge: $n = 10$; nutrients vehicle: $n = 6$). [*]$P < 0.05$, [**]$P < 0.001$ vs. baseline, [††]$P < 0.001$ vs. nutrients vehicle.

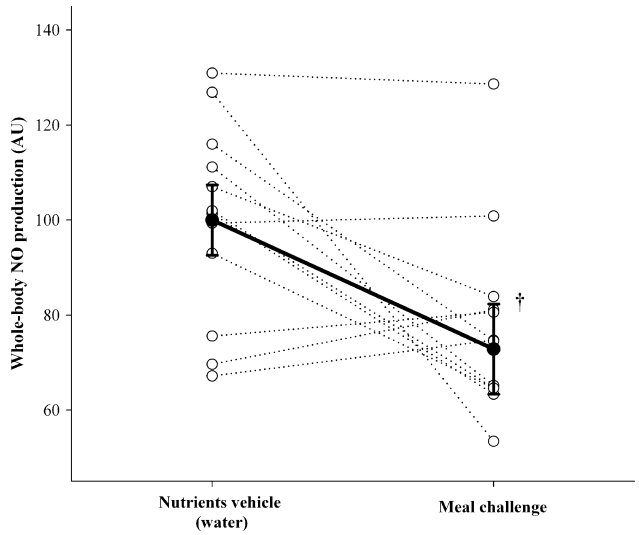


Fig. 5. Whole-body NO production 4 h after ingestion of the meal challenge or nutrients vehicle (water). Values are means ± SEM (meal challenge: $n = 12$; nutrients vehicle: $n = 12$). [†]$P < 0.05$ vs. nutrients vehicle.

challenge could not be explained by changes in the ANP pathway, and was therefore considered as mainly resulting from a decrease in NO bioactivity.

Before the meal challenge, baseline whole-body NO production did not differ between groups (data not shown). Four hours after the meal challenge, when compared to the values after the nutrients vehicle (116.7 ± 8.6‰ dose/μmol_creatinine), the whole-body NO production (Fig. 5) decreased significantly by 27 ± 9% ($P < 0.05$).

Discussion

In this work, we developed a vascular reactivity test that was predominantly mediated by NO release from the endothelium, as evidenced by the fact that the Ach-induced fall in blood pressure was almost completely abolished by the prior administration of L-NAME, a Nitric Oxide Synthase inhibitor. Using this test of endothelial function, we could characterize the postprandial decrease in vascular reactivity and reveal an underlying general alteration in NO production.

The determination of endothelial function using this test might not be free of theoretical bias in the postprandial period, if one assumes that postprandial physiological changes in blood flow may affect the effect of Ach administration on blood pressure. In that case, it may not be possible to discriminate between the indirect effect of the meal and the direct effect of the nutrients. However, we think this theoretical issue is unlikely, or negligible. More importantly, this postprandial decrease in vascular reactivity induced by the meal challenge was expected based on the large body of literature that reported consistent decreases in endothelial function after high-saturated-fat/high-sucrose meals in humans [13,34–36]. Interestingly, in our study, the decrease was marked and there was a strong correlation between postprandial plasma triglycerides and impairment of vascular reactivity. A more precise insight into the qualitative component of postprandial lipemia in relation to endothelial dysfunction (e.g. chylomicron remnants) was not in the scope of the present study. However, since no change was observed in plasma glucose after the meal challenge and the vascular function was impaired in relation to the postprandial increase in plasma triglycerides, our data are in line with the

idea that acute exposure to hypertriglyceridemia contributes significantly to the occurrence of postprandial endothelial dysfunction after the ingestion of mixed, high-fat, high-sucrose meals [37]. These observations confirm that the meal challenge used in the present study should be considered as typical of the meals that induce postprandial physiological and metabolic dysregulations.

In human studies, it has been shown that supplementing a high-saturated-fat meal with high doses of antioxidants prevents the decrease in endothelial vascular reactivity [16,38,39], which suggests, indirectly, that oxidative stress plays a key role in the onset of postprandial endothelial dysfunction [40]. In this regard, the markedly higher aortic production of superoxide anions after the meal, associated with a concomitant dramatic increase in plasma hydroperoxides, which are one of the first products to reflect imbalance in redox homeostasis [41,42], indicates that the meal challenge did generate a marked vascular and systemic oxidative stress. It may be highlighted that this is the first direct evidence, as far as we know, for an increase in vascular oxidative stress in vivo in the postprandial period. We also observed that plasma ORAC tended to slightly increase after the meal. Interestingly, plasma uric acid, which is a major antioxidant as assessed in plasma [43,44], showed a marked postprandial increase. This incidental result deserves a comment. The present observation may be the first suggestion that an increase in uric acid contributes to the regulation of redox status when challenged by the postprandial state. However, conversely, recent studies have suggested that uric acid is independently associated with cardiovascular disease mortality in the general population [45] and may also be directly deleterious to the endothelium [46]. Therefore, further studies are required to understand whether a postprandial increase in uric acid might exert adverse or protective effects on vascular functions.

An increase in ROS production, which can both reduce NO production (e.g. by triggering the decoupling of endothelial NOS) and increase NO scavenging, has widely been advanced to explain impairments in NO bioavailability [47–49]. Likewise, in theory, impairment of endothelium-dependent vascular reactivity is strictly ascribed to a loss of NO bioavailability in the vasculature [1,50]. However, because very few studies have investigated the L-arginine/NO/cGMP pathway in vivo in relation to postprandial endothelial dysfunction, the decrease in endothelium-dependent vascular function is only an indirect indication of impairment in the L-arginine/NO/cGMP pathway. Furthermore, it has to be kept in mind that while vascular reactivity is a physiological response of the vasculature to a stimulation, the assessment of whole-body NO production is a basal (i.e. unstimulated) determination, at the whole-body level. In the present study, we showed that a single high-saturated-fat, high-sucrose meal reduced whole-body NO production as assessed by the recovery of ^{15}N as nitrate after the administration of [$^{15}N_2$]-arginine. This tracer-based method has the advantage of being quantitative and specific for the L-arginine/NO pathway [29] and is considered as a state-of-the-art technique to assess whole-body NO production in vivo. Using the same method, reductions in NO production have been reported in pathological conditions such as essential hypertension [29], in patients with coronary atherosclerosis [51], and recently in hypercholesterolemic subjects [52]. As far we know, this is the first time that a decrease in whole-body NO production is reported during the postprandial state. In addition, we also showed a decrease in plasma cGMP, the second messenger of NO. Because the changes in plasma ANP were very small after the meal challenge, we can rule out that they may account for the marked postprandial decrease in cGMP [53,54]. Therefore, this decrease in cGMP indicates a decline in NO bioavailability [55], showing that the impairment in whole-body NO production did translate into a general postprandial decrease in NO bioactivity.

Potential mechanisms for a decrease in NO production are many, and were not in the scope of the present study. A decrease in constitutive NOS protein, as reported in long-term feeding with high-fat/high-sucrose diets [15,56] seems unlikely in the acute setting. Alternatively, a decrease in NOS activity, in connection with the increase in vascular and systemic production of ROS, might have been mediated by a rapid oxidative degradation of tetrahydrobiopterin, resulting in the decoupling of constitutive NOS [57]. However, other mechanisms might also explain an acute NOS dysregulation.

In conclusion, using an integrative approach in rats, we showed for the first time that, beyond the classical physiological deregulations of the postprandial state, a high-saturated-fat, high-sucrose meal challenge markedly impairs basal systemic whole-body NO production and bioactivity. Interestingly, the finding of a postprandial decrease in whole-body NO production provides a rationale for testing in further studies if strategies to sustain basal NO production may result in a general blunting of the multifaceted expression of postprandial endothelial dysfunction. Lastly, because NO is an ubiquitous intercellular modulator of cell functions implicated in a variety of regulation, this general decrease in NO production may also be implicated in many other postprandial metabolic dysregulations and physiological dysfunctions [58], including adverse postprandial changes in energy substrate metabolism.

Disclosures

None of the authors had a conflict of interest.

Acknowledgment

Joelle Magné is supported by a doctoral fellowship from the French Ministry for Research.

References

[1] J. Davignon, P. Ganz, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis, Circulation 109 (2004) III27–III32.
[2] M. Juonala, J.S. Viikari, T. Laitinen, J. Marniemi, H. Helenius, T. Ronnemaa, O.T. Raitakari, Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study, Circulation 110 (2004) 2918–2923.
[3] H. Brunner, J.R. Cockcroft, J. Deanfield, A. Donald, E. Ferrannini, J. Halcox, W. Kiowski, T.F. Luscher, G. Mancia, A. Natali, J.J. Oliver, A.C. Pessina, D. Rizzoni, G.P. Rossi, A. Salvetti, L.E. Spieker, S. Taddei, D.J. Webb, Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension, J. Hypertens. 23 (2005) 233–246.
[4] N.N. Chan, H.M. Colhoun, P. Vallance, Cardiovascular risk factors as determinants of endothelium-dependent and endothelium-independent vascular reactivity in the general population, J. Am. Coll. Cardiol. 38 (2001) 1814–1820.
[5] E.J. de Koning, T.J. Rabelink, Endothelial function in the post-prandial state, Atheroscler. Suppl. 3 (2002) 11–16.
[6] S. Moncada, E.A. Higgs, The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, Br. J. Pharmacol. 147 (Suppl. 1) (2006) S193–S201.
[7] R.O. Cannon 3rd, Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium, Clin. Chem. 44 (1998) 1809–1819.
[8] J.M. Hare, J.S. Stamler, NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system, J. Clin. Invest. 115 (2005) 509–517.
[9] A.J. Maxwell, Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases, Nitric Oxide 6 (2002) 101–124.
[10] M. Charakida, J. Deanfield, J. Halcox, The role of nitric oxide in early atherosclerosis, Eur. J. Clin. Pharmacol. 62 (2006) 69–78.
[11] C. Napoli, F. de Nigris, S. Williams-Ignarro, O. Pignalosa, V. Sica, L.J. Ignarro, Nitric oxide and atherosclerosis: an update, Nitric Oxide 15 (2006) 265–279.
[12] K.G. Jackson, C.K. Armah, A.M. Minihane, Meal fatty acids and postprandial vascular reactivity, Biochem. Soc. Trans. 35 (2007) 451–453.
[13] H. Gaenzer, W. Sturm, G. Neumayr, R. Kirchmair, C. Ebenbichler, A. Ritsch, B. Foger, G. Weiss, J.R. Patsch, Pronounced postprandial lipemia impairs endothelium-dependent dilation of the brachial artery in men, Cardiovasc. Res. 52 (2001) 509–516.
[14] J.H. O'Keefe, D.S. Bell, Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor, Am. J. Cardiol. 100 (2007) 899–904.

[15] C.K. Roberts, R.J. Barnard, R.K. Sindhu, M. Jurczak, A. Ehdaie, N.D. Vaziri, A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression, J. Appl. Physiol. 98 (2005) 203–210.
[16] H. Sies, W. Stahl, A. Sevanian, Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress, J. Nutr. 135 (2005) 969–972.
[17] S.R. Thomas, K. Chen, J.F. Keaney Jr., Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity, Antioxid. Redox Signal. 5 (2003) 181–194.
[18] S. Devaraj, J. Wang-Polagruto, J. Polagruto, C.L. Keen, I. Jialal, High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome, Metabolism 57 (2008) 867–870.
[19] P.K. Witting, B.S. Rayner, B.J. Wu, N.A. Ellis, R. Stocker, Hydrogen peroxide promotes endothelial dysfunction by stimulating multiple sources of superoxide anion radical production and decreasing nitric oxide bioavailability, Cell. Physiol. Biochem. 20 (2007) 255–268.
[20] E. Lubos, D.E. Handy, J. Loscalzo, Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis, Front. Biosci. 13 (2008) 5323–5344.
[21] M.A. Vincent, E.J. Barrett, J.R. Lindner, M.G. Clark, S. Rattigan, Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285 (2003) E123–E129.
[22] D. Lairon, J. Lopez-Miranda, C. Williams, Methodology for studying postprandial lipid metabolism, Eur. J. Clin. Nutr. 61 (2007) 1145–1161.
[23] A. Avogaro, G. Toffolo, E. Kiwanuka, S.V. de Kreutzenberg, P. Tessari, C. Cobelli, L-arginine–nitric oxide kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: a stable-labelled 15N arginine approach, Diabetes 52 (2003) 795–802.
[24] M. Feng, S. Whitesall, Y. Zhang, M. Beibel, L.D. Alecy, K. DiPetrillo, Validation of volume–pressure recording tail-cuff blood pressure measurements, Am. J. Hypertens. 21 (2008) 1288–1291.
[25] C. Gay, J.M. Gebicki, A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay, Anal. Biochem. 284 (2000) 217–220.
[26] S.Y. Ching, J. Hall, K. Croft, J. Beilby, E. Rossi, E. Ghisalberti, Antioxidant inhibition of oxygen radicals for measurement of total antioxidant capacity in biological samples, Anal. Biochem. 353 (2006) 257–265.
[27] M.L. Hu, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, Methods Enzymol. 233 (1994) 380–385.
[28] A. Oudot, C. Martin, D. Busseuil, C. Vergely, L. Demaison, L. Rochette, NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging, Free Radic. Biol. Med. 40 (2006) 2214–2222.
[29] P. Forte, M. Copland, L.M. Smith, E. Milne, J. Sutherland, N. Benjamin, Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension, Lancet 349 (1997) 837–842.
[30] C. Blouet, F. Mariotti, V. Mathe, D. Tome, J.F. Huneau, Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats, Exp. Biol. Med. (Maywood) 232 (2007) 1458–1464.
[31] F. Mariotti, J.F. Huneau, I. Szezepanski, K.J. Petzke, Y. Aggoun, D. Tome, D. Bonnet, Meal amino acids with varied levels of arginine do not affect postprandial vascular endothelial function in healthy young men, J. Nutr. 137 (2007) 1383–1389.
[32] D.J. Herman, P.D. Brooks, M. Ashraf, F. Azam, R.L. Mulvaney, Evaluation of methods for N-15 analysis of inorganic nitrogen in soil extracts: 2. Diffusion methods, Commun. Soil Sci. Plant Anal. 26 (1995) 1675–1685.
[33] M. Marzinzig, A.K. Nussler, J. Stadler, E. Marzinzig, W. Barthlen, N.C. Nussler, H.G. Beger, S.M. Morris Jr., U.B. Bruckner, Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols, Nitric Oxide 1 (1997) 177–189.
[34] R.A. Vogel, M.C. Corretti, G.D. Plotnick, Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects, Am. J. Cardiol. 79 (1997) 350–354.
[35] S.J. Nicholls, P. Lundman, J.A. Harmer, B. Cutri, K.A. Griffiths, K.A. Rye, P.J. Barter, D.S. Celermajer, Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function, J. Am. Coll. Cardiol. 48 (2006) 715–720.
[36] G.D. Norata, A.L. Catapano, Triglyceride-rich lipoproteins from normotrygliceridemic subjects and hyperlipidemic patients differently affect endothelial cell activation and gene expression patterns, Circ. Res. 100 (2007) e81.
[37] G.B. Vigna, C. Delli Gatti, R. Fellin, Endothelial function and postprandial lipemia, Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 14 (2004) 121–127.
[38] G.D. Plotnick, M.C. Corretti, R.A. Vogel, Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal, JAMA 278 (1997) 1682–1686.
[39] R.A. Vogel, M.C. Corretti, G.D. Plotnick, The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function, J. Am. Coll. Cardiol. 36 (2000) 1455–1460.
[40] H. Cai, D.G. Harrison, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, Circ. Res. 87 (2000) 840–844.
[41] W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, Physiol. Rev. 82 (2002) 47–95.
[42] H. Cai, Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences, Cardiovasc. Res. 68 (2005) 26–36.
[43] A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, Free Radic. Biol. Med. 18 (1995) 29–36.
[44] G. Cao, R.L. Prior, Postprandial increases in serum antioxidant capacity in older women, J. Appl. Physiol. 89 (2000) 877–883.
[45] C. Meisinger, W. Koenig, J. Baumert, A. Doring, Uric acid levels are associated with all-cause and cardiovascular disease mortality independent of systemic inflammation in men from the general population. The MONICA/KORA cohort study, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28 (2008) 1186–1192.
[46] W.S. Waring, D.J. Webb, S.R. Maxwell, Uric acid as a risk factor for cardiovascular disease, QJM 93 (2000) 707–713.
[47] T. Munzel, A. Daiber, V. Ullrich, A. Mulsch, Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25 (2005) 1551–1557.
[48] L.J. Ignarro, M.L. Balestrieri, C. Napoli, Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update, Cardiovasc. Res. 73 (2007) 326–340.
[49] D. Tomasian, J.F. Keaney, J.A. Vita, Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide, Cardiovasc. Res. 47 (2000) 426–435.
[50] D.G. Harrison, Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2153–2157.
[51] P.D. O'Kane, G. Jackson, A. Ferro, Whole body nitric oxide production is not decreased in patients with coronary atherosclerosis but is inversely related to plasma homocysteine, Atherosclerosis 196 (2008) 574–579.
[52] R. Maas, E. Schwedhelm, L. Kahl, H. Li, R. Benndorf, N. Luneburg, U. Forstermann, R.H. Boger, Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia, Clin. Chem. 54 (2008) 292–300.
[53] J.A. Carvajal, A.M. Germain, J.P. Huidobro-Toro, C.P. Weiner, Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation, J. Cell. Physiol. 184 (2000) 409–420.
[54] J. Mair, B. Puschendorf, Is measurement of cyclic guanosine monophosphate in plasma or urine suitable for assessing in vivo nitric oxide production?, Circulation 97 (1998) 1209–1210
[55] A. Friebe, D. Koesling, Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase, Circ. Res. 93 (2003) 96–105.
[56] F. Bourgoin, H. Bachelard, M. Badeau, S. Melancon, M. Pitre, R. Lariviere, A. Nadeau, Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 295 (2008) H1044–H1055.
[57] K.M. Channon, Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease, Trends Cardiovasc. Med. 14 (2004) 323–327.
[58] W.S. Jobgen, S.K. Fried, W.J. Fu, C.J. Meininger, G. Wu, Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates, J. Nutr. Biochem. 17 (2006) 571–588.

Article 2: Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue

The journal of Nutritional Biochemistry, 2009 Apr 8. [Ahead of print] *doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.004*

Joëlle Magné, François Mariotti, Romy Fischer, Véronique Mathé, Daniel Tomé et Jean François Huneau

Introduction et objectifs

L'inflammation à bas bruit contribue de façon majeure à l'initiation et au développement de l'athérosclérose (Ross 1999; Libby 2007). Chez des sujets sains, de nombreuses études ont démontré que des repas riches en acides gras saturés induisaient de l'inflammation à bas bruit caractérisée par de l'activation leucocytaire et une augmentation de marqueurs proinflammatoires et pro-thrombotiques et associée à de la dysfonction endothéliale postprandiale (Alipour *et al.* 2007; O'Keefe et Bell 2007). Cependant, bien que le tissu adipeux soit considéré comme une source importante de cytokines proinflammatoires (Kershaw et Flier 2004; Katagiri *et al.* 2007), très peu de données ont examiné le rôle du tissu adipeux dans la réponse inflammatoire postprandiale. Récemment, une étude *in vitro* a démontré que l'incubation d'adipocytes en présence de fortes doses d'acides gras saturés induisait une activation de la voie TLR/NF-κB (Suganami et al. 2007). Par conséquent, nous avons, dans un premier temps, cherché à décrire la cinétique d'apparition de la réponse inflammatoire induite par un repas riche en acides gras saturés, afin d'examiner, dans un second temps, en situation postprandiale, la voie d'activation de NF-κB dans le tissu adipeux viscéral, plus particulièrement impliqué dans l'athérogenèse.

Matériels et méthodes

Chez des rats Wistar-kyoto (9 semaines), nous avons effectué des prélèvements sanguins avant, puis 2, 4 et 6h après le test de charge hyperlipidique (n=10) ou la charge en eau (n=6), afin d'évaluer les concentrations plasmatiques en triglycérides, CRP, sICAM-1, IL-6, IL-1β, PAI-1, MCP-1 plasmatiques. Des échantillons de sang total prélevés avant, puis 2h après les tests de charge ont été utilisés afin d'évaluer les marqueurs d'activation

leucocytaire par cytométrie en flux. Le sacrifice de 24 rats a été réalisé 2h ou 6 h après les deux tests expérimentaux afin de prélever le tissu adipeux pour y déterminer l'activation de NF-κB et analyser l'expression des transcrits de PAI-1, IL-6, TNF-α, TLR4 et NOX-2 par RT-PCR.

Résultats et Discussion

Cette étude confirme l'augmentation postprandiale de cytokines proinflammatoires et pro-thrombotiques (IL-6 et PAI-1) induite après un repas hyperlipidique. Cette réponse inflammatoire postprandiale est observée, de façon très précoce, dès 2h après le test de charge hyperlipidique, par rapport à l'altération de la réactivité vasculaire, confirmant ainsi le fait que l'inflammation à bas bruit soit une composante importante dans l'établissement de la dysfonction endothéliale postprandiale (de Koning et Rabelink 2002; Davignon et Ganz 2004). Cette étude corrobore également la présence d'une activation leucocytaire dès la phase postprandiale, caractérisée par une augmentation du nombre de neutrophiles et une augmentation de l'expression de l'intégrine CD11B et de la sélectine CD62L au niveau des leucocytes (Van Oostrom *et al.* 2003a; van Oostrom *et al.* 2003b; Burdge et Calder 2005; Alipour *et al.* 2007). Par ailleurs, nous avons observé une diminution postprandiale du nombre et de l'expression de CD62L au niveau des lymphocytes B, ce qui laisserait probablement suggérer un recrutement des lymphocytes B par l'intestin (Chandra 1997).
De façon plus intéressante, cette étude met en évidence, pour la première fois, une activation de NF-κB au niveau du tissu adipeux viscérale, induite par un repas hyperlipidique. Il est intéressant de souligner que l'augmentation postprandiale des marqueurs proinflammatoires et pro-thrombotiques, et l'activation de NF-κB sont transitoires, observées seulement 2h après le test de charge hyperlipidique. L'importance de ce facteur de transcription dans l'activation de nombreuses voies d'activation inflammatoire (Perkins 2006) et le fait que nos observations soient réalisées chez des rats sains sont autant d'indications permettant d'expliquer le contrôle de l'activation NF-κB dans le tissu adipeux pendant la phase postprandiale.

Cette étude suggère pour la première fois que le tissu adipeux viscéral est un contributeur important de l'inflammation à bas bruit lors de l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale. D'autres études restent à réaliser afin de préciser les voies de signalisation inflammatoires et l'implication des différents types cellulaires du tissu adipeux.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Journal of Nutritional Biochemistry xx (2009) xxx–xxx
Journal of Nutritional Biochemistry

Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue☆

Joëlle Magné[a,b,1], François Mariotti[a,b,*], Romy Fischer[a,b], Véronique Mathé[a,b], Daniel Tomé[a,b], Jean François Huneau[a,b]

[a]UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, INRA, CRNH-IdF, F-75005 Paris, France
[b]UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, AgroParisTech, CNRH-IdF, F-75005 Paris, France

Received 4 November 2008; received in revised form 5 March 2009; accepted 5 March 2009

Abstract

In the postprandial period, low-grade inflammation may contribute to vascular endothelial dysfunction, a hallmark of atherogenesis. Little is known about the involvement of the adipose tissue in the initiation of the postprandial inflammatory response such as obtained after a high-saturated fat meal (HFM). In the present study, we first studied the time course of appearance of systemic inflammation after a HFM in healthy rats, and then we investigated whether a HFM activates the inflammatory signaling in the visceral adipose tissue, with a focus on the key component, nuclear factor-κB (NF-κB). Two hours after the HFM, plasma IL-6 and PAI-1, but not plasma C-reactive protein and soluble intracellular adhesion molecule-1, showed a marked, transient increase. These changes were specific to the postprandial state as not observed after a control water load. Neutrophils count and activation markers CD11B and CD62L, assessed by flow cytometry, also rose significantly 2 h after the HFM, while remaining steady after the control. At the same time, the HFM decreased significantly B-cell count and expression of the activation marker CD62L. Interestingly, at the same early time after the HFM, in the visceral adipose tissue, there was a 2.2-fold increase in the activation of NF-κB (p65) in nuclear extract and an increase in IL-6 mRNA. As far as we know, this is the first study evidencing an acute, postprandial activation of inflammation in visceral adipose tissue. This early activation of NF-κB pathway after a HFM may play a triggering role in the initiation of the complex postprandial proatherogenic phenotype. © 2009 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Low-grade inflammation; Adipose tissue; Postprandial state; Animal model; Endothelial dysfunction

1. Introduction

In the last decade, low-grade inflammation has been recognized as a common feature in the onset and the progression of obesity, type II diabetes mellitus and cardiovascular diseases [1,2]. In close association with vascular endothelial dysfunction, the initiation of systemic low-grade inflammation is probably a major contributor to atherogenesis [3,4]. Furthermore, low-grade inflammation is also a component of the complex proatherogenic phenotype occurring during the postprandial state, as shown after a single high-saturated fat meal (HFM) in healthy humans [5,6].

The postprandial inflammatory response has been identified principally in plasma and leukocytes [7]. A HFM has been well documented to increase the concentrations of circulating proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and the soluble adhesion molecules such as soluble intracellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in plasma [8]. Likewise, more recently, it has been reported that postprandial hypertriglyceridemia increases circulating leukocytes [9,10] and results in the activation of the proinflammatory nuclear factor-κB (NF-κB) in monocytes [11,12]. However, our current knowledge of the postprandial inflammatory response remains fragmentary and incomplete [13].

One important gap in our knowledge concerns the potential role of the adipose tissue in the postprandial low-grade inflammation. This has little been investigated, although the adipose tissue is known as an important source of proinflammatory cytokines [14,15]. In particular, the visceral adipose tissue, which is believed to account for most of the fat deposit-related inflammation that may favor the initiation or accelerate atherosclerosis [16,17], is expected to be very sensitive to the nutrient flux [7,18]. However, because no animal model of postprandial pathophysiological dysregulations under healthy conditions has been used to date, our understanding of the potential role of the visceral adipose tissue in systemic postprandial

☆ Disclosures: none of the authors had a conflict of interest.

* Corresponding author. UMR914 INRA-AgroParisTech Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, AgroParisTech, F-75005 Paris, France. Tel.: +33144087286; fax: +33144081858.
E-mail address: francois.mariotti@agroparistech.fr (F. Mariotti).

[1] Joelle Magné is supported by a doctoral fellowship from the French Ministry for Research.

0955-2863/$ - see front matter © 2009 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.jnutbio.2009.03.004

inflammation only builds on *in vitro* approaches [19]. Recently, Suganami et al. [20] have demonstrated that saturated fatty acids could directly activate the Toll-like receptor-4 (TLR4)/NF-κB pathway, inducing proinflammatory changes in adipocytes. Therefore, a fatty acid-induced activation of NF-κB in adipose tissue may be involved in postprandial inflammation and atherogenesis, but direct evidences for a postprandial activation of inflammatory signaling in the adipose tissue under *in vivo* nutritional conditions are still lacking.

In the present study, using a rat model of postprandial dysfunction in which we previously evidenced the occurrence of postprandial vascular dysfunction after a HFM [21], we first sought to study the time course of appearance of systemic low-grade inflammation after a HFM. To rule out any role of the circadian variations or experimental-related effect on the inflammatory markers during the postprandial state, i.e., ascertain that the observation can be specifically attributed to the postprandial situation, we used a water load as a control. After this characterization of the postprandial inflammatory response in this animal model, we investigated the postprandial activation of the NF-κB pathway activation in visceral adipose tissue.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar-Kyoto rats (9 weeks old, Harlan, France) were housed four per cage in a temperature-regulated room (22±2°C) on a 12:12h light/dark cycle, with free access to tap water and standard rat chow. A total of 40 rats were used in two series of studies reported here.

The study protocol was approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethics Committee, and all procedures were performed in accordance with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee.

2.2. Study design

During 3 weeks before postprandial studies, 16 rats were accustomed to the experimental conditions. The HFM consisted in a 5-ml emulsion made of palm oil, sucrose, milk protein and 2.5 ml water. The fatty acid composition of the refined palm oil was 43–46% palmitate, 37–41% of oleate, 9–12% linoleate, 4–6% stearate and <2% other fatty acids. The energy nutrient content of the HFM was (% total energy, 25 kcal) 60% lipids, 20% carbohydrates and 20% protein. This lipid level, which slightly exaggerates the fat content of a real high-fat meal in humans (such as a fast-food meal), has been reported to ensure the substantial onset of a series of acute postprandial pathophysiological dysregulations in postprandial models [13]. Likewise, we chose a HFM that included carbohydrates and proteins so that the postprandial processing of dietary triglycerides would occur under the metabolic conditions of the postprandial state. A 2.5-ml water load was used as a control to assess whether circadian variations and experimental conditions due to handling, gavage and blood sampling may affect the postprandial parameters.

All tests began after a 12-h fast. An indwelling catheter, filled with heparinized 2% NaCl (50 U/ml), was inserted into a lateral tail vein to allow frequent blood sampling with minimal discomfort for the conscious animal. Venous blood was sampled before, 2, 4 and 6 h after the HFM (n=10) or the water load (n=6). Fresh whole blood was collected into heparinized prechilled tubes and was used immediately for determination of leukocyte activation markers. All other blood samples were drawn into sodium EDTA (2 mg/ml) prechilled tubes and were centrifuged for 5 min at 3500×g at 4°C. Plasma was stored at −80°C for further determinations (as described below).

In a last experiment, 24 rats were killed 2 or 6 h after the HFM (n=12) or the water load (n=12) and the liver and epididymal adipose tissue were rapidly sampled on ice for the determination of NF-κB activation, as described below, or frozen immediately in liquid nitrogen and stored at −80°C until gene expression analysis.

2.3. Biochemical analysis

Plasma triglyceride concentrations were determined using an enzymatic method (TG PAP150, Biomerieux). Plasma concentrations of IL-6, PAI-1, interleukin-1β (IL-1β) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were determined simultaneously by multiplex immunoassay (Linco) on a Luminex-200 analyzer (Biorad). Plasma concentrations of sICAM-1 and C-reactive protein (CRP) were quantified using commercial ELISA kits (R&D Systems and Helica Biosystem, respectively).

2.4. NF-κB p65 activation assay

After the homogenization of adipose tissue and liver in a dounce homogenizer on ice, nuclear fractions were isolated using a nuclear extract kit (Active Motif). A 10-μg protein sample of nuclear extract was used to assess NF-κB activation with a NF-κB p65-DNA binding assay kit (Active Motif) according to the manufacturer's recommendations. The specificity of the detection of NF-κB activation was checked using a consensus sequence provided by the manufacturer.

2.5. Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from adipose tissue using Trizol reagent (Invitrogen). Four hundred nanograms of total RNA was converted into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit (Applied Biosystems) on a PTC-200 thermocycler (MJ Research). Real-time PCR amplifications were performed with a Prism7300 sequence detection system using SYBRGreen MasterMix (Applied Biosystems). PAI-1, IL-6, TNF-α, NADPH oxidase subunit gp91phox (NOX2) and TLR4 mRNA levels were expressed as a ratio of ribosomal 18S RNA levels.

2.6. Assessment leukocyte activation markers

Heparinized 25 μl whole-blood samples were incubated at room temperature for 5 min with 2 μl anti-rat CD32 monoclonal antibody (Fc Block, BD Pharmingen). Fluorescence-labeled monoclonal antibodies (FITC-CD11b, PE-CD62L, Cy5-CD45RA, APC-CD3, BD Pharmingen), with *ad hoc* dilutions, were added and the mixture was incubated at room temperature for 15 min in the dark. Lysis of the red blood cells was performed by adding 200 μl FACS lysing solution (BD Pharmingen). After washing and centrifugation, the samples were thoroughly mixed with 100 μl PBS and then analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Pharmingen). The leukocyte events number was considered as the leukocyte count.

2.7. Statistical analysis

Data were expressed as means±S.E.M. Data were tested for normality and homogeneity of variance. If one of these assumptions was not satisfied, the data were log transformed before analysis. When the outcomes were repeated (over time and/or meal types), data were analyzed using mixed model procedures under SAS (SAS Institute), with meal and time used as fixed effects and interaction between the two was tested. When a fixed effect or interaction was significant or tended to be (P<1), *post hoc* testing was performed with the Tukey–Kramer adjustment. Gene expression was analyzed using two-way ANOVA with time and meal as fixed effects and one-tailed Tukey studentized t test for *post hoc* comparisons. A value of P<.05 was determined to be statistically significant.

3. Results

When compared to the values found after the water load, mean plasma triglycerides (Fig. 1) steadily increased, being twice (198±13%, P<001) the baseline values 6 h after the HFM.

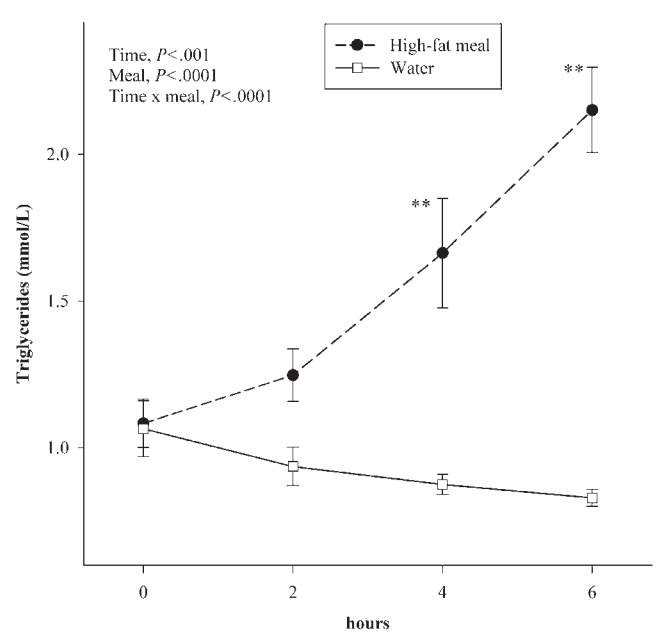


Fig. 1. Plasma triglycerides before and after the high-fat load or water load. Values are means±S.E.M. (high-fat load: n=10; water load: n=6). **P<.001 vs. baseline.

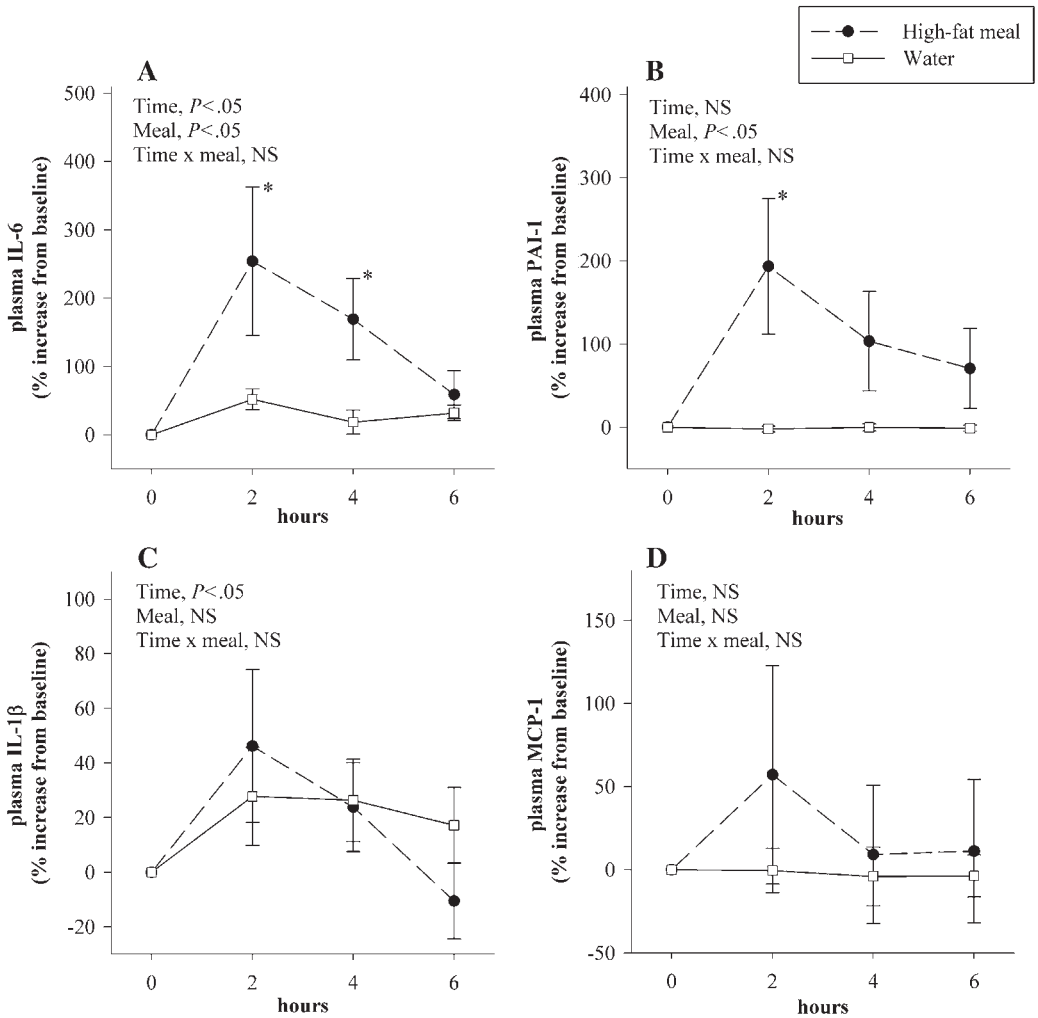


Fig. 2. Systemic markers of low-grade inflammation before and after the high-fat meal or water load. Plasma IL-6 (A), PAI-1 (B), IL-1β (C) and MCP-1 (D) values are means±S.E.M. (high-fat load: n=10; water load: n=6). *P<.05, **P<.001 vs. baseline.

3.1. Systemic markers of low-grade inflammation

Plasma IL-6 and PAI-1 (Fig. 2A and B) significantly increased after the HFM, when compared to baseline values and the values found after the water load. Two hours after the HFM, plasma IL-6 and PAI-1 (Fig. 2A and B) displayed a maximum increase of 254±109% and 197±81%, respectively, as compared to the water load (P<.05). Changes in plasma IL-1β (Fig. 2C) did not differ after the HFM as compared to the water load. Plasma MCP-1 (Fig. 2D) and plasma sICAM-1 and CRP (data not shown) did not vary significantly after the HFM.

3.2. Leukocyte activation markers

The HFM increased neutrophil count (P<.05 vs. water load; Fig. 3A) and decreased B-cell count (P<.05 vs. water load), while not significantly affecting monocyte and T-cell counts. The number of neutrophils expressing CD62L and CD11B (Fig. 3B and C) increased significantly after the HFM (P<.05 vs. water load), while remaining unchanged for monocytes. A significant decrease in B-cells expressing CD62L (Fig. 3B) was observed after the HFM (P<.05 vs. water load).

3.3. NF-κB activation and inflammatory gene expression in adipose tissue

The amounts of activated NF-κB in nuclear extract from liver were below the lower limit of quantification of the method whatever the meal and the time of sampling. When compared to the values found after the water load, activated NF-κB (Fig. 4) was 2.2-fold higher (P<.05) in adipose tissue collected 2 h after the HFM. By contrast, 6 h after the HFM, activated NF-κB no longer differed from those after the water load.

When compared to the water load, IL-6 gene expression in adipose tissue (Fig. 5) was 3.6-fold higher (P=.06) 2 h after the HFM, while being similar 6 h after the HFM. By contrast, TNF-α, NOX2 and TLR4 gene expressions in adipose tissue remained very similar, 2 and 6 h after the HFM, to those after the water load (data not shown).

4. Discussion

It has been well documented that the adverse postprandial effects of a HFM, in particular vascular endothelial dysfunction, are generally associated with increase in proinflammatory markers [4,6,7]. In this context, the post-meal increase in plasma IL-6 and PAI-1 was expected and is consistent with the general proinflammatory and prothrombotic effects of hypertriglyceridemia [6]. Nevertheless, it is noteworthy that this increase in circulating markers of low-grade inflammation was transient and occurred very early (2 h after the HFM) when compared to the gradual increase in plasma triglycerides. Conversely, we observed no changes in plasma CRP after the HFM, but to our knowledge, there has been no report of an acute effect of high-fat meal on plasma CRP in healthy subjects [6]. Very recently, Dekker et

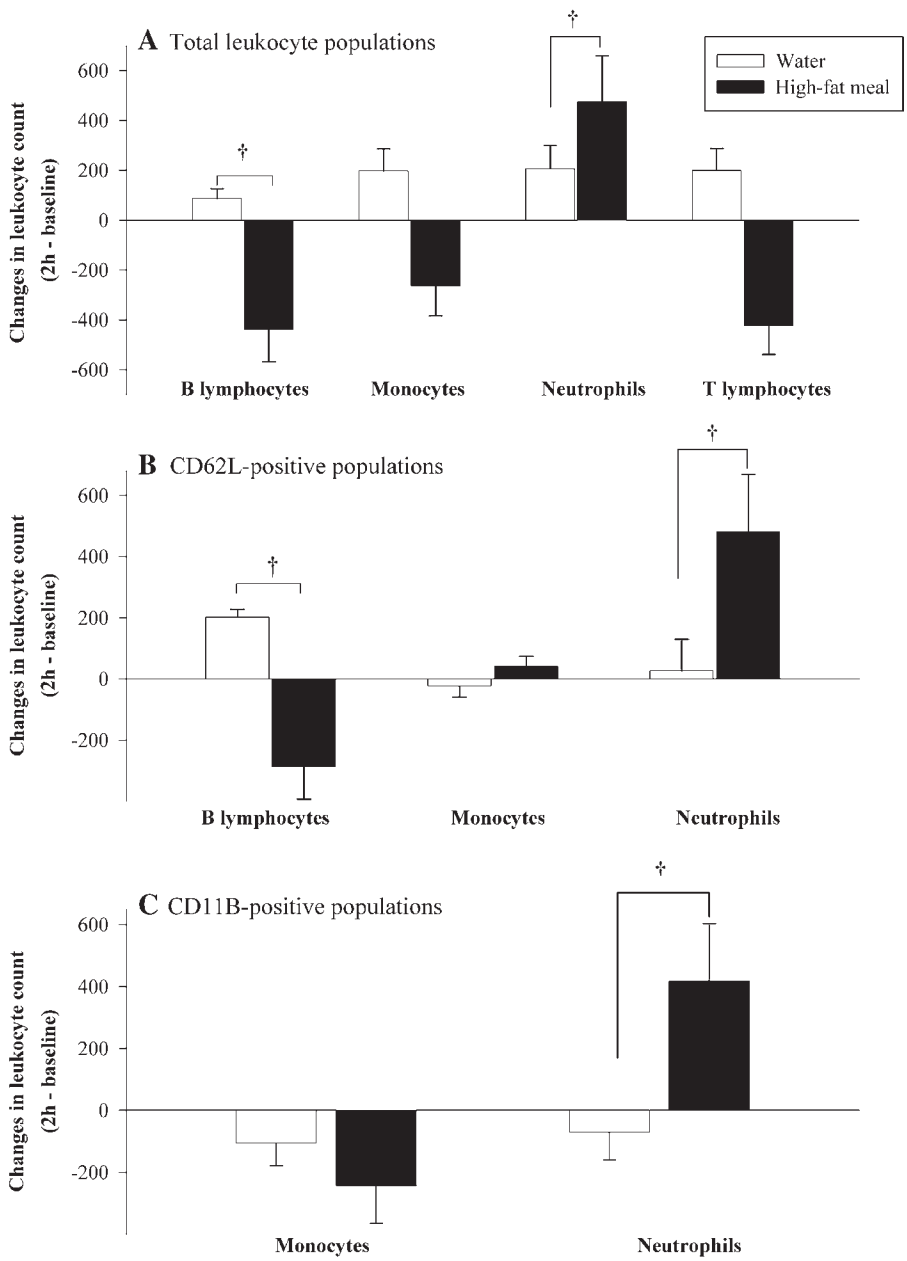


Fig. 3. Total leukocyte population (A) and activated population as characterized by CD62L-positive populations (B) and CD11B-positive populations (C), 2 h after the high-fat meal or water load. Values are means±S.E.M. (n=5) and are expressed as changes from baseline. †P<.05 vs. water load.

al. [22] have demonstrated that the postprandial rate of change in plasma CRP slightly increased only in subjects with high-fasting triglycerides as compared with low-fasting triglycerides. This finding strengthens the idea that plasma CRP may be more relevant in predicting the risk of cardiovascular disease in conditions of chronic low-grade inflammation.

To further inspect the postprandial inflammatory response in the early hours after the HFM, we examined leukocyte activation markers, such as the integrin CD11B and the selectin CD62L, which are implicated in the leukocyte adherence to the endothelium [23]. Two hours after the load, the HFM increased the neutrophil count concomitantly with enhancing the expression of the adhesion proteins CD11B and CD62L on neutrophils. These results are in line with those obtained by Van Oostrom et al. [9,24] indicating that neutrophils, which displayed a postprandial increase in their capability for adhesion and recruitment, may be actively involved in postprandial low-grade inflammation. Incidentally, our study shows a decrease in B-cell count and expression of CD62L 2 h after the HFM. However, to the best of our knowledge, no data on B cells' involvement in atherogenesis have ever been reported and this result may rather support the hypothesis that B-cells can be recruited by the gut after a meal [25].

To examine the mechanisms underlying postprandial inflammatory signaling, *in vitro* studies have suggested that triglyceride-rich lipoproteins isolated from human plasma after a HFM may directly induce inflammatory changes affecting both endothelial cells and leukocytes [26]. Concomitant with postprandial endothelial activation, Suganami et al. [20] recently suggested that saturated fat could activate the TLR4/NF-κB pathway in a coculture of adipocytes and macrophages, suggesting a contribution of adipose tissue to postprandial inflammation. For the first time in an *in vivo* model, our study shows that a HFM can evoke an early transient activation of the

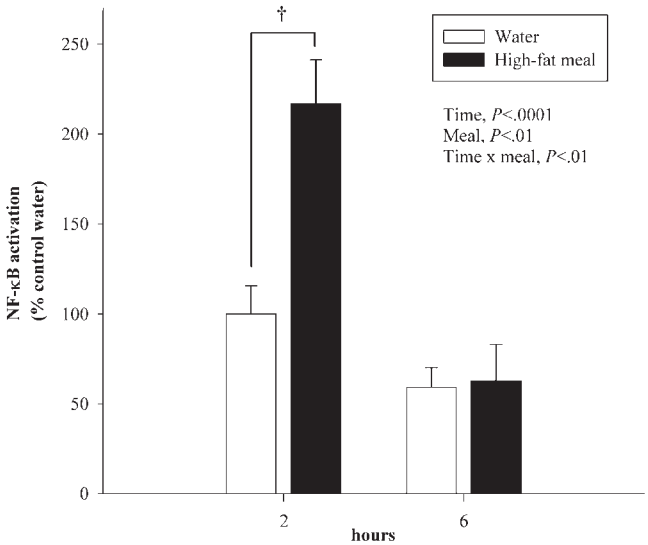


Fig. 4. NF-κB activation in adipose tissue 2 and 6 h after the high-fat meal or water load. Values are means±S.E.M. (n=6). †P<.05 vs. water load.

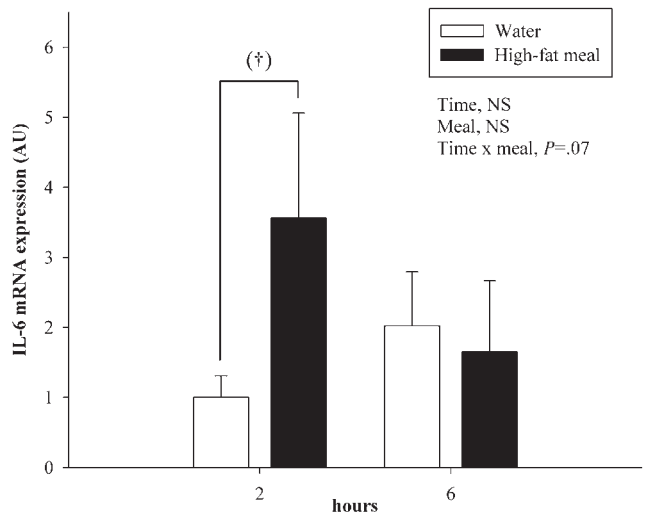


Fig. 5. IL-6 mRNA expression in adipose tissue 2 and 6 h after the high-fat meal or water load. Values are means±S.E.M. (n=6). †P=.06 vs. water load.

transcription factor NF-κB, a primary effector of inflammatory signaling activation, in visceral adipose tissue. This activation of NF-κB pathway in adipose tissue is supported by an acute increase in IL-6 gene expression (a NF-κB target gene) in visceral adipose tissue. It is noteworthy that postprandial activation of NF- κB and IL-6 up-regulation in adipose tissue is consistent with the marked increase of IL-6 in plasma. In fact, the adipose tissue, and particularly the visceral adipose tissue, is an endocrine organ [14,27], and a significant part of IL-6 recovered in the circulation is secreted by the adipose tissue [28,29]. Emerging data have recently suggested that macrophages of adipose tissue may play an important role in chronic inflammation and obesity [30,31]. As we studied here the whole visceral adipose tissue, further studies are needed to understand which type of cells is specifically involved in the inflammatory response reported here.

Furthermore, in accordance with the importance of NF-κB pathway-related functions including inflammatory responses, cellular growth and apoptosis, the activity of NF-κB pathway is highly regulated in the organism [32]. This tight control of NF-κB signaling may explain why, in healthy rats, during the postprandial state, the marked activation of this inflammatory pathway was transient. Interestingly, in a previous study, Patel et al. [33] have observed that, in mononuclear cells, the postprandial activation of NF-κB was more prolonged in obese individuals than in lean individuals. This finding is in line with the idea that the repeated exposure to proinflammatory HFM, in synergy with obesity, paves the way to a chronic low-grade inflammation and to the series of dysregulations and dysfunctions that cluster together [34]. Therefore, understanding the mechanisms underlying the regulation of the postprandial activation of NF-κB in the adipose tissue would be of particular interest in comprehending the pathogenesis of obesity. Given the importance of this pleitropic modulator of inflammation, our findings may drive future investigations to further delineate the early postprandial initiation of inflammation in visceral adipose tissue and its contribution to systemic low-grade inflammation during the postprandial state.

In conclusion, in this animal model of postprandial acute pathophysiological dysregulations, we revealed for the first time that a HFM early induces a transient activation of NF-κB in visceral adipose tissue. Taken together, the results suggest that the very early activation of inflammatory pathways in the adipose tissue may play a central role in the initiation of systemic low-grade inflammation, which is an early feature in the postprandial proatherogenic phenotype. Further studies are needed to inspect the role of the visceral adipose tissue in postprandial inflammation and atherogenesis.

Acknowledgments

We acknowledge the contribution of Flore Giraudet to data collection.

References

[1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002;420(6917):868–74.
[2] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340(2):115–26.
[3] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004;109(23 Suppl 1):III27–III32.
[4] de Koning EJ, Rabelink TJ. Endothelial function in the post-prandial state. Atheroscler Suppl 2002;3(1):11–6.
[5] O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. Am J Cardiol 2007;100(5):899–904.
[6] Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. Biochem Soc Trans 2007;35(Pt 3):466–9.
[7] Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? Br J Nutr 2005;93(1):3–9.
[8] Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. J Am Coll Cardiol 2002;39(7):1145–50.
[9] Van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Rabelink TJ, Van Asbeck BS, Cabezas MC. Postprandial leukocyte increase in healthy subjects. Metabolism 2003;52(2):199–202.
[10] van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HW, De Jaegere PP, et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. Atherosclerosis 2004;177(1):175–82.
[11] Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Perez-Martinez P, Muriana FJ, Martin-Ventura JL, et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. Am J Clin Nutr 2004;80(6):1487–91.
[12] Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. Diabetes 2003;52(12):2882–7.
[13] Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C. Methodology for studying postprandial lipid metabolism. Eur J Clin Nutr 2007;61(10):1145–61.
[14] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 2004;89(6):2548–56.
[15] Katagiri H, Yamada T, Oka Y. Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. Circ Res 2007;101(1):27–39.
[16] Ohman MK, Shen Y, Obimba CI, Wright AP, Warnock M, Lawrence DA, et al. Visceral adipose tissue inflammation accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 2008;117(6):798–805.

[17] Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. Circulation 2007;116(11):1234–41.
[18] Einstein FH, Atzmon G, Yang XM, Ma XH, Rincon M, Rudin E, et al. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. Diabetes 2005;54(3):672–8.
[19] Ajuwon KM, Spurlock ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. J Nutr 2005;135(8):1841–6.
[20] Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007;27(1):84–91.
[21] Magne J, Mariotti F, Tome D, Huneau JF. A rat model for studying the postprandial appearance of vascular endothelial dysfunction. FASEB J 2007;21(5):A375–b.
[22] Dekker MJ, Wright AJ, Mazurak VC, Marangoni AG, Rush JW, Graham TE, et al. Fasting triacylglycerol status, but not polyunsaturated/saturated fatty acid ratio, influences the postprandial response to a series of oral fat tolerance tests. J Nutr Biochem 2008.
[23] Peschel T, Niebauer J. Role of pro-atherogenic adhesion molecules and inflammatory cytokines in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2. Cytometry B Clin Cytom 2003;53(1):78–85.
[24] van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Koning EJ, Rabelink TJ, et al. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. J Lipid Res 2003;44(3):576–83.
[25] Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. Am J Clin Nutr 1997;66(2):460S–3S.
[26] Alipour A, van Oostrom AJ, Izraeljan A, Verseyden C, Collins JM, Frayn KN, et al. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28(4):792–7.
[27] Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. Diabetologia 2002;45(9):1201–10.
[28] Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. J Clin Endocrinol Metab 1997;82(12):4196–200.
[29] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev 2006;86(2):515–81.
[30] Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest 2003;112(12):1821–30.
[31] Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? J Clin Invest 2006;116(1):33–5.
[32] Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. Oncogene 2006;25(51):6717–30.
[33] Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Sia CL, Viswanathan P, Mohanty P, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. J Clin Endocrinol Metab 2007;92(11):4476–9.
[34] Poppitt SD. Postprandial lipaemia, haemostasis, inflammatory response and other emerging risk factors for cardiovascular disease: the influence of fatty meals. Curr Nutr Food Sci 2005;1:23–34.

CHAPITRE 3 : MODULATION DE LA NATURE DES PROTEINES D'UN REPAS HYPERLIPIDIQUE ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE POSTPRANDIALE

Article 3: Rapeseed protein in a high-fat mixed meal alleviates postprandial systemic and vascular oxidative stress and prevents vascular endothelial dysfunction in healthy rats

The journal of nutrition, 2009, Sep; 139(9):1660-6..

Joëlle Magné, Jean François Huneau, Dimitrios Tsikas, Stéphanie Delemasure, Luc Rochette, Daniel Tomé et François Mariotti.

Introduction et objectifs

Chez des sujets sains, de nombreuses études ont démontré que des repas riches en acides gras saturés induisaient une dysfonction endothéliale postprandiale caractérisée par une triade de dérégulations métaboliques : diminution de la réactivité vasculaire, inflammation à bas bruit et augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (de Koning et Rabelink 2002; Vigna *et al.* 2004; Burdge et Calder 2005; Poppitt 2005; Sies *et al.* 2005; Jackson *et al.* 2007). Cependant, bien que des supplémentations en certains acides aminés aient démontré un effet bénéfique sur la fonction endothéliale vasculaire, l'impact de la qualité des protéines alimentaires dans l'initiation de la dysfonction endothéliale a été très peu étudié.

Deux acides aminés candidats peuvent avoir un impact sur les différentes fonctions de l'endothélium. L'arginine, en tant que précurseur du NO, a fait l'objet de nombreuses études chez l'animal et chez l'homme. Ainsi, il a été rapporté que des supplémentations en L-Arginine, à des doses pharmacologiques et à des doses nutritionnelles, réduisaient la dysfonction endothéliale observée chez des sujets à risque ou atteints de pathologies cardiovasculaires athérothrombotiques (Preli *et al.* 2002; Gornik et Creager 2004; Siasos *et al.* 2007). Très récemment, l'équipe de Lin a montré que l'ingestion d'une dose unique de 15g d'arginine réduisait l'altération postprandiale de la fonction endothéliale ainsi que le stress oxydant postprandial (Lin et al. 2008). En outre, la cystéine en tant que précurseur du glutathion apparait comme un candidat pertinent dans la modulation de la dysfonction endothéliale, d'autant plus qu'il a été montré que des supplémentations en L-cystéine, peuvent réduire la production d'espèces radicalaires (Ashfaq *et al.* 2006; Blouet *et al.* 2007a).

Dans ce contexte, par leur richesse en arginine et en cystéine, les protéines de colza ont retenu toute notre attention. En effet, lors d'une précédente étude, nous avions montré que la substitution des protéines de lait par des protéines de colza réduisait l'installation l'insulino-résistance, chez des rats soumis à un régime riche en acides gras saturés et riche en saccharose (Mariotti *et al.* 2008).

Par conséquent, nous avons utilisé un modèle de dysfonction endothéliale postprandiale précédemment caractérisée chez le rat sain, afin d'explorer le potentiel nutritionnel des protéines alimentaires à moduler le risque cardiovasculaire. Nous avons voulu tester l'hypothèse d'un effet protecteur des protéines de colza sur la dysfonction endothéliale postprandiale. Nous avons également examiné si le contenu en arginine et en cystéine des protéines de colza pouvait expliquer les effets potentiellement bénéfiques des protéines de colza sur les fonctions endothéliales vasculaires.

Matériels et méthodes

Un total de 48 rats wistar-kyoto (9 semaines), préalablement habitués aux différentes conditions expérimentales (manipulation, contention, cathétérisation de la veine latérale caudale et mesure de pression artérielle par pléthysmographie), a été utilisé lors de trois expériences.

Lors d'une première étude en dispositif croisé, nous avons effectué sur 12 rats des tests de réactivité vasculaire avant, puis 2, 4 et 6h après l'ingestion de trois repas hyperlipidiques isoénergétiques de 25kcal (60% d'huile de palme, 20% de saccharose et 20% de protéines) avec différentes natures de protéines : protéines de lait purifiées, isolé de protéines de colza, protéines de lait purifiées additionnées de cystéine et d'arginine à hauteur des teneurs naturelles des protéines de colza. Des prélèvements sanguins ont été réalisés afin d'évaluer les concentrations en triglycérides, hydroperoxydes, IL-6, IL-1β, PAI-1, MCP-1 plasmatiques et en glutathion total et oxydé au niveau du sang total.

Lors d'une seconde expérience en dispositif croisé, 12 rats supplémentaires ont été utilisés pour une autre série de prélèvements sanguins afin d'évaluer les concentrations en GMP_C, nitrite, nitrate et nitrotyrosine plasmatiques.

Enfin, le sacrifice des animaux a été réalisé 6 h après les trois repas expérimentaux (n=8 pour chaque repas) afin de prélever l'aorte abdominale pour y évaluer la production vasculaire d'anions superoxyde.

Résultats et Discussion

Cette étude montre un effet protecteur des protéines de colza sur l'apparition de dysfonction endothéliale postprandiale, que nous pouvons attribuer majoritairement au contenu en arginine et en cystéine. Ainsi, la substitution dans le repas hyperlipidique des protéines de lait par des protéines de colza, prévient complètement l'altération postprandiale de la réactivité vasculaire. Cet effet des protéines de colza sur la fonction endothéliale vasculaire était partiellement mimé par l'adjonction d'arginine et de cystéine à hauteur des teneurs naturelles des protéines de colza. Au regard de la complexité du profil de l'aminogramme plasmatique lors de la phase postprandiale, nous pouvons supposer que des mécanismes additionnels impliquant d'autres acides aminés sont également à l'origine de la modulation de fonction endothéliale par les protéines de colza.

Alors que l'inflammation à bas bruit postprandiale induite par le repas hyperlipidique n'est pas modulée par la nature des protéines du repas, les effets bénéfiques des protéines de colza sur la fonction endothéliale vasculaire sont accompagnés d'une réduction partielle de la production postprandiale des concentrations en hydroperoxydes plasmatiques et d'une diminution de la production vasculaire d'anions superoxydes. Ces résultats démontrent que les protéines de colza exercent un effet protecteur sur le stress oxydant aussi bien au niveau systémique qu'au niveau vasculaire, suggérant ainsi que les protéines de colza exercent leur bénéfice en limitant le stress oxydant. D'autres études seront nécessaires afin d'examiner l'intérêt d'une utilisation des protéines de colza en alimentation humaine.

Supplemental Material can be found at:
http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/jn.109.107441/DC1

The Journal of Nutrition
Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions

Rapeseed Protein in a High-Fat Mixed Meal Alleviates Postprandial Systemic and Vascular Oxidative Stress and Prevents Vascular Endothelial Dysfunction in Healthy Rats[1–3]

Joëlle Magné,[4,5] Jean François Huneau,[4,5] Dimitrios Tsikas,[6] Stéphanie Delemasure,[7] Luc Rochette,[7] Daniel Tomé[4,5] and François Mariotti[4,5]*

[4]AgroParisTech, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France; [5]INRA, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France; [6]Institute of Clinical Pharmacology, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany; and [7]Laboratory of Experimental Cardiovascular Pathophysiology and Pharmacology, Faculties of Medicine and Pharmacy, F-21000 Dijon, France.

Abstract

High-saturated fat and high-sucrose meals induce vascular endothelial dysfunction, the early hallmark of atherogenesis. The impact of dietary protein on vascular homeostasis remains misunderstood. In this study, we investigated whether rapeseed protein, an emergent arginine- and cysteine-rich protein, can acutely modulate the onset of adverse effects induced by a high-saturated fat meal (HFM). In a series of crossover experiments, healthy rats received 3 HFM (saturated fat: 60%; sucrose: 20%; protein: 20% energy) with the protein source being either total milk protein (MP; control), rapeseed protein (RP), or MP supplemented with cysteine and arginine to the same level as in RP (MP+AA). Endothelium-related vascular reactivity, measured as an acetylcholine-induced transient decrease in blood pressure, and plasma triglycerides, hydroperoxides, cyclic GMP (cGMP), and free 3-nitrotyrosine were measured before and 2, 4, and 6 h after meals. Superoxide anion production, expressed as ethidine fluorescence, was measured in the aorta 6 h after meals. Whereas plasma triglycerides rose similarly in all meals, the decrease in vascular reactivity after MP was attenuated after MP+AA and entirely prevented after RP. The type of meal had no consistent effect on plasma cGMP and free 3-nitrotyrosine over the postprandial period. The postprandial increase in plasma hydroperoxides differed according to the meal, and concentrations were 43% lower 6 h after MP+AA and RP than after MP. Aortic superoxide anion production was 36% lower 6 h after RP than MP. These results show that substituting rapeseed protein for milk protein markedly reduces vascular and oxidative disturbances induced by an HFM and this may be mediated in part by cysteine and arginine. J. Nutr. 139: 1660–1666, 2009.

Introduction

Vascular endothelial function is an integrative marker of vascular homeostasis. The alteration of vascular endothelial function is the key event in the early pathophysiology of atherosclerosis (1) and predicts a wide range of cardiovascular diseases (2,3). High-saturated fat and high-sucrose intake are considered nutritional risk factors for cardiovascular diseases (4–7), not only in patients at high risk, but also in healthy individuals (8), and adverse effects have been documented in both chronic and acute exposures. Interestingly, in healthy humans, a single high-fat and/or high-sucrose meal induces a series of transient metabolic and physiological dysregulations (9–11), including impaired vascular reactivity (12), low-grade inflammation (13), and generation of reactive oxygen species (ROS)[8] (14). However, there is a paucity of information regarding the effect of dietary protein on the initiation of this complex proatherogenic phenotype.

Interest in amino acids in relation to vascular health has focused on L-arginine, because it is the precursor of nitric oxide (NO), which is the pivotal molecule in vascular homeostasis (7).

[1] Supported in part by grants from the Technical Centre for Oilseed Crops (Pessac, France) and the National Agency for Oilseed Development (Paris, France). J. M. is supported by a doctoral fellowship from the French Ministry of Research.

[2] Author disclosures: J. Magné, J. F. Huneau, D. Tsikas, S. Delemasure, L. Rochette, D. Tomé, and F. Mariotti, no conflicts of interest.

[3] Supplemental Figure 1 and Supplemental Table 1 are available with the online posting of this paper at jn.nutrition.org.

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

[8] Abbreviations used: cGMP, cyclic GMP; HFM, high-saturated fat meal; IL, interleukin; MAP, mean arterial pressure; MP, milk protein high-fat meal; MP+AA, milk protein+amino acids high-fat meal; NO, nitric oxide; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; ROS, reactive oxygen species; RP, rapeseed protein high-fat meal.

0022-3166/08 $8.00 © 2009 American Society for Nutrition.

Manuscript received March 18, 2009. Initial review completed April 26, 2009. Revision accepted June 10, 2009.
First published online July 8, 2009; doi:10.3945/jn.109.107441.

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009

Medium and long-term supplementation of high levels of L-arginine improves vascular endothelial function in patients at risk for cardiovascular diseases (15–17). Importantly, it has been very recently reported that a nutritional dose of L-arginine added to a high-fat meal partially alleviated postprandial vascular endothelial dysfunction (18). Westphal et al. (19) also reported that in healthy volunteers, postprandial endothelial dysfunction can be neutralized by the addition of proteins to the fatty meal. Although it has been suggested that the favorable effect of proteins on vascular reactivity may partly be related to the increase in arginine bioavailability, the 2 tested protein sources, even though providing low and high arginine levels, resulted in a similar protective effect on vascular endothelial function (19). Taken together, it remains to be determined whether the potential benefits of dietary protein on vascular health may be influenced by L-arginine content.

Among other amino acids suspected of having affecting vascular homeostasis, cysteine is an interesting candidate. Supplementation in dietary cysteine has been reported to reduce diet-induced oxidative stress and insulin resistance in rats (20). This protective effect was notably accompanied by an alteration of glutathione redox status, which has been reported to be an early marker of atherosclerosis in healthy humans (21). Therefore, the amount of cysteine in a meal can impact glutathione status, which in turn may limit oxidative stress.

Because rapeseed (*Brassica napus*) protein has the particularity of being rich in arginine and very rich in cysteine, it is an attractive candidate for exploring the effect of dietary protein on the initiation of vascular dysfunction and oxidative stress, which is considered as central to the onset of postprandial endothelial dysfunction. Recently, rapeseed protein, an emergent plant protein commonly used in animal feed, has gained interest in human nutrition (22). Interestingly, we showed in a recent study that substituting rapeseed protein for milk protein for 9 wk had preventive effects on the initiation of insulin resistance induced by a high-saturated fat, high-sucrose diet (23).

In this study, in a model of postprandial endothelial dysfunction, which we recently developed and characterized in healthy rats (24), we hypothesized that substituting rapeseed protein for milk protein may modulate oxidative, inflammatory, and vascular disturbances induced by a high-saturated fat meal (HFM). We also examined whether the specific, combined high level of arginine and cysteine in rapeseed protein may explain the potential benefits of rapeseed protein.

Materials and Methods

Animals. Male Wistar-kyoto rats (9 wk old) obtained from Harlan (France) were housed 4 per cage in a temperature-regulated room (22 ± 2°C) on a 12-h-light/-dark cycle. They had free access to tap water and standard rat diet (Safe A04, UAR) throughout the study. We used a total of 48 rats for the series of studies.

The study protocol was approved by the Regional (Ile de France Sud) Animal Care and Ethics Committee and all procedures were performed in accordance with the guidelines issued by the French National Animal Care Committee.

Study design. For 3 wk before postprandial studies, rats were acclimated to experimental conditions that included handling, gastric gavage, restraining, and endothelial function test as described below.

A crossover study design was used. Each of the 12 rats received the 3 experimental meals separated by a wash-out period of 7–9 d between meals, which both minimizes a potential age drift effect and allows a full animal recovery between each experiment. The 3 HFM consisted of a 5-mL emulsion made of 2.5 mL of water, palm oil, sucrose, and protein. The protein source was either standard total milk proteins (MP), rapeseed protein isolate (RP), or standard total MP supplemented with L-cysteine and L-arginine (MP+AA) to the same level as in rapeseed protein isolate (**Table 1**). The standard total milk protein (Armor proteins) was simply derived from skim milk precipitation and the rapeseed protein isolate was prepared as previously described (22). The energy macronutrient composition of the 3 isoenergetic HFM was (percent of total 105 kJ) 60% lipids, 20% carbohydrates, and 20% protein (Table 1).

All tests started after 12-h food deprivation. An indwelling catheter filled with heparinized 2% NaCl (50 kU/L) was inserted into a distal lateral tail vein to allow frequent blood sampling and injection with minimal discomfort for the conscious animal. Venous blood was sampled and vascular reactivity was tested before and 2, 4, and 6 h after the oral HFM. Fresh whole blood was immediately used to measure glucose. All other blood samples were drawn into sodium EDTA or heparinized prechilled tubes and were centrifuged at 3500 × *g* for 5 min at 4°C. Plasma was stored at −80°C for measurement of triglycerides and proinflammatory and oxidative stress markers, as described below.

For measuring plasma cyclic GMP (cGMP), nitrite, nitrate, and free 3-nitrotyrosine, we withdrew blood samples from an additional 12 rats in the same crossover study design.

In a final experiment, 24 rats were killed 6 h after administration of the 3 HFM (for each, $n = 8$) and the abdominal aorta was embedded on OCT (Dako) and cut into 10-μm-thick sections for oxidative fluorescent detection. The sections were immediately stored at −80°C.

Vascular reactivity test. In a quiet and temperature-controlled room (26 ± 2°C), systolic and diastolic blood pressure were measured in conscious rats by volume-pressure recording using an automated tail-cuff plethysmograph (XBP1000, Kent Scientific). The mean arterial pressure (MAP), calculated as one-third systolic plus two-thirds diastolic blood pressure, was derived from means of 10 consecutive blood pressure recordings per rat.

Vascular reactivity was measured as the transient decrease in MAP response after the i.v. administration of a 20-μg/kg acetylcholine bolus, as previously described (24). Vascular reactivity was expressed as the relative decrease in blood pressure, i.e. as [(MAP measured immediately after acetylcholine injection − MAP measured before acetylcholine injection)/MAP measured before acetylcholine injection] × 100.

For each preprandial and postprandial (2, 4, and 6 h) determination on each rat, the vascular reactivity was calculated as the mean response to 3 consecutive i.v. administrations of an acetylcholine bolus, with a minimum of 5 min between each injection.

TABLE 1 Macronutrient content and protein composition of HFM

Composition	MP	RP	MP+AA
Macronutrient content, *g*			
Palm oil	1.67	1.67	1.67
Sucrose	1.25	1.25	1.25
Protein[1]	1.25	1.25	1.25
Protein composition, *mg*		Protein source	
	Total milk protein	Rapeseed protein isolate	Total milk protein
L-Arginine			
Native	42.5	75	42.5
Supplemented	0	0	32.5
Total	42.5	75	75
L-Cysteine			
Native	10.6	25	10.6
Supplemented	0	0	14.4
Total	10.6	25	25

[1] Calculated using specific conversion factors; i.e. N×5.35 for the rapeseed protein isolate and N×6.25 for the total milk protein (50).

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009

Special preanalytical treatments. For measurement of whole-blood glutathione, 2 additional 70-μL blood samples were flash-frozen in liquid nitrogen, thawed, and immediately deproteinized by the addition of 70 μL trichloroacetic acid (10%, wt:v, 4°C), vortexed, and centrifuged at 20,000 × *g* for 10 min at 4°C. The supernatant was assayed and kept at 4°C on the same day.

Because of the ubiquitous nature of nitrite and nitrate, all tips and tubes used for this batch of blood samples were prerinsed with ultra-pure water (25,26). Furthermore, to minimize the degradation of nitrite, blood samples were immediately centrifuged for at 5000 × *g* for 1 min at 2°C. Plasma was immediately separated and stored at −80°C. To prevent the breakdown of cyclic GMP (cGMP) by phosphodiesterase activities, 3-isobutyl-1-methylxanthine (10 mmol/L, 30 μL in 500 μL plasma) was added immediately after separation of plasma from heparinized blood.

Analytical procedures

Plasma biochemistry. Plasma triglyceride concentrations were measured by an enzymatic method (TG PAP150, Biomerieux). Glucose concentrations were measured in whole blood using a Glucometer (Roche Diagnostics). Whole-blood oxidized glutathione and total glutathione were measured using the enzymatic recycling method described by Anderson et al. (27). Plasma concentrations of amino acids were measured after deproteinization with sulfosalicylic acid by ion-exchange chromatography (Bio-Tek Instruments ARL). After reduction with triphenylphosphine, plasma was deproteinized with sulfosalicycylic acid for the measurement of plasma total cysteine by reverse-phase HPLC using precolumn derivatization with 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,13,benzoxadiazole as described by Santa (28). Plasma cGMP concentrations were measured using ELISA with a prior acetylation step (Assay Designs). Plasma concentrations of interleukin (IL)-6, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), IL-1β, and monocyte chemoattractant protein-1 were measured on a Bio-Plex system (Bio-Rad). The hydrogen peroxide concentration was measured in heparinized plasma by the ferrous ion oxidation in xylenol orange assay (29). Simultaneous quantification of plasma nitrate and nitrite was performed by a GC-MS method (30). Free 3-nitrotyrosine in plasma was quantified by a fully validated GC-tandem MS method (31).

Vascular oxidative fluorescence. Vascular oxidative stress was evaluated by dihydroethidium/4′,6-diamidino-2-phenyindole double staining in aortic sections (32). Basically, dihydroethidium is cell permeable and reacts with O_2^- to form ethidine, which in turn intercalates with DNA, producing a nuclear fluorescence. The number of nuclei per section was determined by dihydroethidium/4′,6-diamidino-2-phenyindole staining. The fluorescent images of aortic sections were acquired with a fluorescent microscope (Eclipse 600, Nikon) connected to a video camera (Tri CCD, Sony). The results were expressed as the ethidine fluorescence/nucleus.

Statistical analysis. Data were expressed as means ± SEM. Statistical analysis of the data were carried out using mixed model procedures for repeated measurements, with meal, time, period, and treatment order used as fixed effects and the interaction between the meal and time was tested. When it was significant, post hoc testing was performed under the mixed model with the Tukey-Kramer adjustment. A value of $P < 0.05$ was considered significant. Although period and treatment order were not significant for any variables, they were kept in the mixed models. Data were analyzed using SAS.

Results

After administration of the 3 HFM, plasma triglycerides (**Fig. 1**) steadily increased ($P < 0.0001$), reaching twice the level of baseline values 6 h after ingestion, but the increases did not differ among the 3 meals. Baseline glucose concentrations did not differ before the 3 tests and were 5.5 ± 0.2, 5.5 ± 0.2, and 5.2 ± 0.2 mmol/L preprandially for the MP, RP, and MP+AA tests, respectively. Blood glucose did not vary over time or among meals during the postprandial study (data not shown).

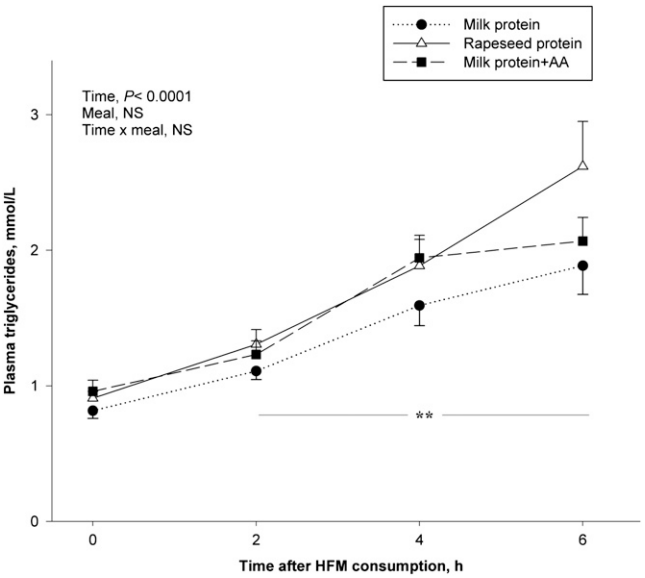


FIGURE 1 Plasma triglycerides in healthy rats before and after ingestion of HFM that contained standard total milk protein, rapeseed protein isolate (RP), or total milk protein supplemented with L-cysteine and L-arginine (MP+AA) to the same level as in rapeseed protein isolate. Values are means ± SEM, *n* = 12.**Different from baseline, $P < 0.001$.

The plasma amino acid profile exhibited complex changes after the meals, with concentrations of most amino acids being higher after RP than after MP (**Supplemental Table 1**). Before rats had consumed the HFM, plasma arginine did not differ among the 3 tests and were 73.5 ± 4.4, 10.6 ± 2.0, and 84.4 ± 3.4 μmol/L for the MP, RP, and MP+AA tests, respectively. Preprandial plasma cysteine concentrations also did not differ and were 103.6 ± 3.2, 92.2 ± 10.6, and 76.6 ± 5.7 μmol/L before the MP, RP, and MP+AA tests, respectively. Whereas plasma arginine did not vary after ingestion of MP, it increased at 2 h after ingestion of MP+AA and 4 h after ingestion of RP (**Fig. 2***A*). Plasma arginine was significantly higher 4 h and 6 h after the ingestion of RP or MP+AA than after ingestion of MP (Fig. 2*A*). Plasma total cysteine (Fig. 2*B*) did not significantly vary over time and was not affected by the HFM. Whole-blood oxidized glutathione and total glutathione did not change over time after HFM intake or among the 3 meals (data not shown).

Vascular reactivity. Baseline MAP concentrations did not differ before the 3 tests and were 105.3 ± 1.8, 103.9 ± 1.8, and 105.5 ± 1.9 mmHg preprandially for the MP, RP, and MP+AA tests, respectively. Compared with baseline, MP induced a significant postprandial decrease in vascular reactivity (**Fig. 3**), from 22 ± 1% at baseline to 9 ± 3% and 11 ± 2% at 4 h and 6 h, respectively, after ingestion. This decrease was completely blunted after ingestion of RP and the vascular reactivity differed at all time points ($P < 0.001$) from that after ingestion of MP. Two hours after ingestion of MP+AA, vascular reactivity was not less than at baseline, did not differ from after ingestion of RP, and was significantly higher than after MP.

NO bioavailability and production. Plasma nitrite (**Fig. 4***A*) did not vary over time or among the 3 meals. Compared with baseline, MP induced a pronounced and sustained decrease in plasma cGMP as of 2 h after ingestion (time effect, $P < 0.0001$) (Fig. 4*B*). This decrease did not differ after ingestion of RP or

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009

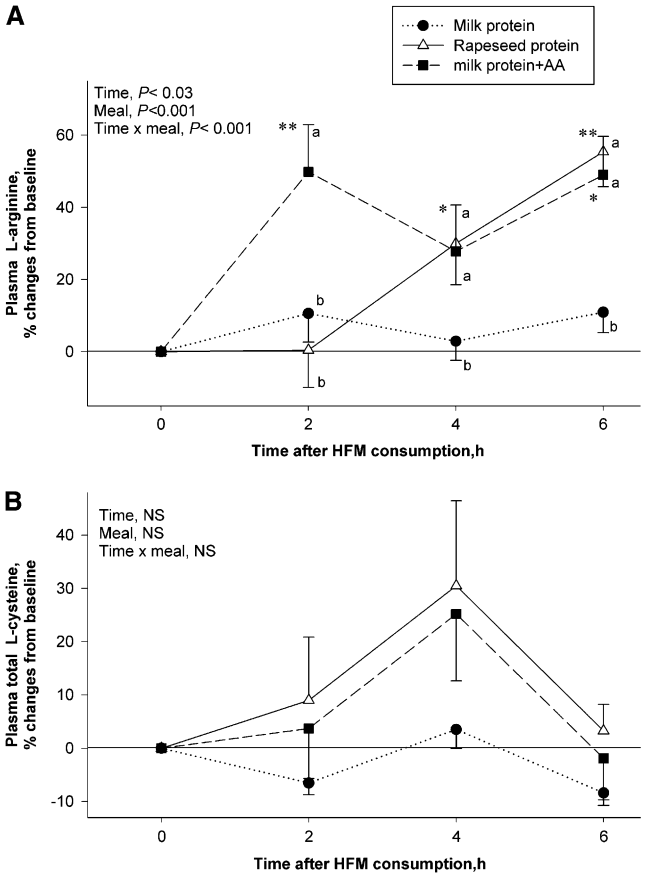


FIGURE 2 Plasma L-arginine (*A*) and plasma total L-cysteine (*B*) in healthy rats before and after ingestion of HFM that contained standard total milk protein, rapeseed protein isolate (RP), or total milk protein supplemented with L-cysteine and L-arginine (MP+AA) to the same level as in rapeseed protein isolate. Values are means ± SEM, $n = 6$. *Different from baseline, $P < 0.05$; **$P < 0.001$. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

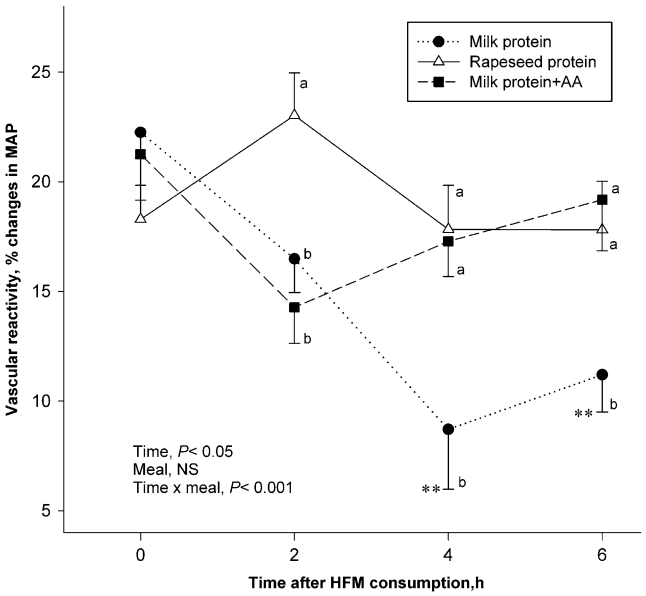


FIGURE 3 Vascular reactivity in healthy rats before and after ingestion of HFM that contained standard total milk protein, rapeseed protein isolate (RP), or total milk protein supplemented with L-cysteine and L-arginine (MP+AA) to the same level as in rapeseed protein isolate. Values are means ± SEM, $n = 12$. **Different from baseline, $P < 0.001$. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

MP+AA. However, when post hoc testing was performed, the decrease was significantly less pronounced 2 h after RP than after MP.

Plasma free 3-nitrotyrosine (Fig. 4C) did not significantly vary during the postprandial period. Postprandial plasma free 3-nitrotyrosine did not vary among the 3 HFM. Plasma nitrate did not vary over time or among meals during the postprandial study (data not shown).

Oxidative stress markers. The plasma hydroperoxide concentration increased with time and was higher than at baseline at all time points after all 3 meals (**Fig. 5***A*) ($P < 0.001$). This increase was significantly less pronounced 2 h after the MP+AA tests and 6 h after ingestion of RP or MP+AA compared with meals MP. Aortic superoxide anion production, expressed as ethidine fluorescence related to cellular density, was significantly lower 6 h after RP than after MP (Fig. 5*B*).

Systemic markers of low-grade inflammation. Six hours after the ingestion of the 3 HFM, plasma IL-6, IL-1β, and PAI-1 concentrations were greater than at baseline ($P < 0.0001$), but the increases did not differ among the 3 meals. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 did not change over time after HFM intake or among the meals (**Supplemental Fig. 1**).

Discussion

The most salient finding of this study was that modulating the protein source of the HFM had a marked protective effect on postprandial endothelial function in healthy rats.

Endothelial function is primarily evaluated using a vascular reactivity test of the response of the endothelium to a physiological or pharmacological stimulus (11,33) and this response is considered to be principally due to a transient stimulation of NO production (1,34). Accordingly, we had previously developed a vascular reactivity test performed on conscious rats that proved to be predominantly mediated by NO release, because the acetylcholine-induced decrease in blood pressure was virtually entirely inhibited by the prior administration of the NO synthase inhibitor, L-NAME (1,24). In this study, using this test of endothelial function, we observed, in accordance with human studies (4,12), that the HFM that included milk protein markedly decreased vascular reactivity in healthy rats. Strikingly, using this HFM as the control meal, we found that substituting rapeseed protein for milk protein entirely prevented postprandial vascular dysfunction.

The rationale for specifically testing rapeseed protein was its high content in both arginine and cysteine, which are the most interesting amino acid candidates in the modulation of vascular health. In this regard, it is an interesting finding that the HFM that included milk protein with L-arginine and cysteine at the same level as in rapeseed protein showed a (delayed) neutralization of the postprandial decrease in vascular reactivity. On the basis of this observation, we attribute, for the most part, the protective effect of rapeseed protein on vascular endothelial function to the content in those 2 amino acids. Incidentally, this result also indicates that supplementing L-arginine and -cysteine to a HFM at a nutritional level could exert a protective effect on vascular function during the postprandial period. Indeed, we observed that the rapeseed protein HFM and the HFM that included milk protein with L-arginine and -cysteine induced an

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009

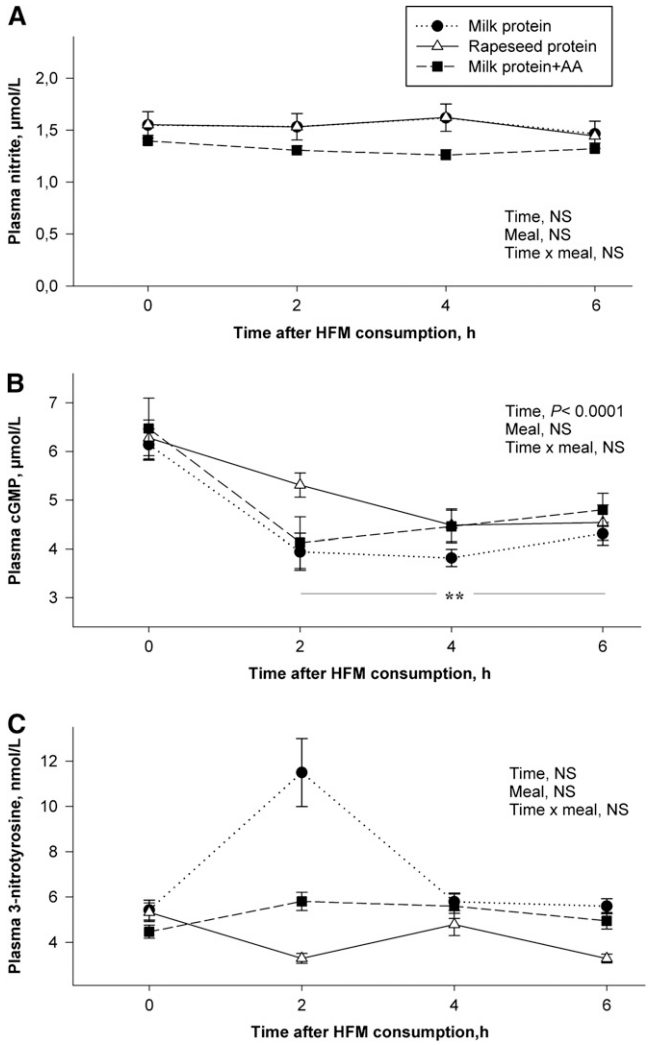


FIGURE 4 Systemic markers of NO production/bioavailability in healthy rats before and after ingestion of HFM that contained standard total milk protein, rapeseed protein isolate (RP), or total milk protein supplemented with L-cysteine and L-arginine (MP+AA) to the same level as in rapeseed protein isolate. Plasma nitrite (*A*), plasma cGMP (*B*), and plasma free 3-nitrotyrosine (*C*) before and after ingestion of HFM. Values are means ± SEM, n = 12. **Different from baseline, $P < 0.001$.

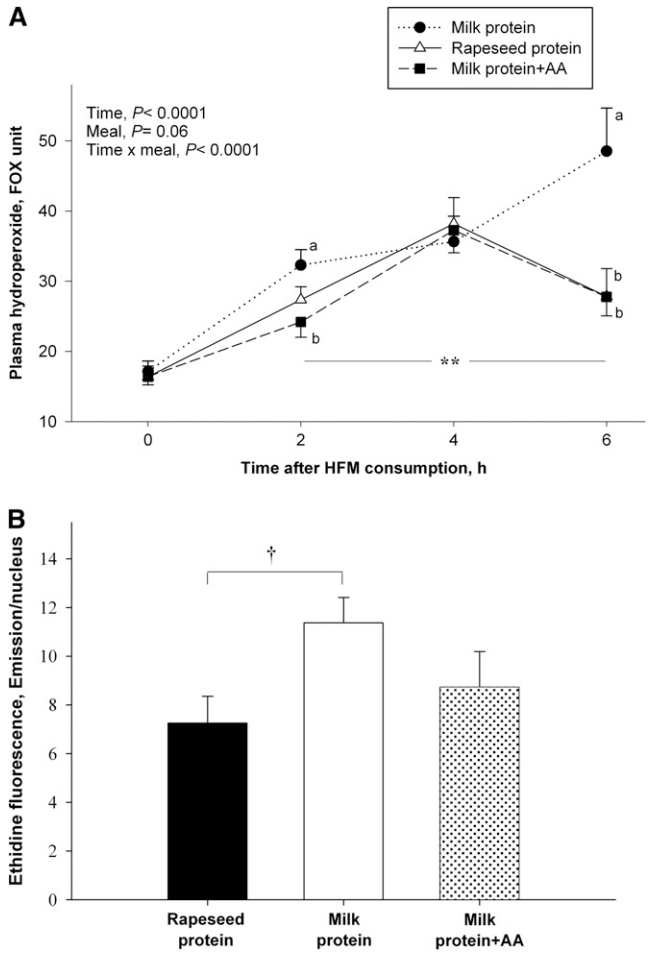


FIGURE 5 Systemic and vascular oxidative stress in healthy rats before and after ingestion of HFM that contained standard total milk protein, rapeseed protein isolate (RP), or total milk protein supplemented with L-cysteine and L-arginine (MP+AA) to the same level as in rapeseed protein isolate. (*A*) Plasma hydroperoxides before and after ingestion of HFM. Values are means ± SEM, n = 12. **Different from baseline, $P < 0.001$. Means without a common letter differ, $P < 0.05$. (*B*) Ethidine fluorescence quantification 6 h after ingestion of HFM. Values are means ± SEM, n = 8. †Different from HFM that included MP, $P < 0.05$.

increase in plasma arginine and tended to increase plasma cysteine (P = 0.08). However, as shown by the analysis of the pattern of plasma AA, the concentration of many other amino acids was affected by changes in the nature of the protein source. Accordingly, further studies with single amino acid supplementation and different combinations of amino acids are needed to identify the specific role played by each of these amino acids, alone or in synergy, in the protection of vascular endothelial function.

Beyond the impairment in vascular reactivity, postprandial endothelial dysfunction is a multifaceted dysregulation, which is also characterized by low-grade inflammation, closely associated with postprandial lipemia (9,11,13,35,36). In the present study, substitution of rapeseed protein for milk protein did not affect the gradual increase in plasma triglycerides. This is in line with a previous report showing no effect of the protein on HFM-induced hypertriglyceridemia (19). In the present study, the protein nature of the HFM also did not affect the marked postprandial increases in PAI-1 and plasma cytokines (IL-6 and IL-1β), suggesting that the potent protective effect of rapeseed protein on vascular reactivity is not related to a reduction of the proinflammatory effect of the HFM.

Impairment of vascular reactivity is strictly related to a decrease in NO production/bioavailability (1,11,34). Although plasma nitrite has been largely reported as a good biomarker of endothelial NO synthase activity (37,38), in this study, regardless of the meal, there was no postprandial change in plasma nitrite. Interestingly, even though plasma nitrite has been closely associated with endothelial dysfunction under chronic conditions (37), to the best of our knowledge, no study has reported a basal loss in plasma nitrite during the postprandial period. The absence of changes in plasma nitrite concentration after HFM may suggest that plasma nitrite may not be an adequate marker of acute changes in endothelial function such as those elicited by a HFM. Likewise, we have chosen plasma cGMP and free 3-nitrotyrosine as 2 systemic markers to reflect postprandial changes in systemic NO bioavailability. The decrease in plasma cGMP induced by the 2 HFM that included milk protein can thus be interpreted as a decrease in downstream signaling on its main target, guanylyl cyclase (39), insofar as we have previously

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009

shown that changes in plasma atrial natriuretic peptides after the HFM were not significant (40,41). In contrast, after ingestion of the HFM that included milk protein, we found no changes in plasma 3-nitrotyrosine, which indirectly reflects inactivation of NO by superoxide anions (42,43). More to the point, the effect of rapeseed protein on plasma cGMP and free 3-nitrotyrosine are relatively inconsistent compared with the marked protective effect of rapeseed protein on vascular function. As a result, these markers provided no further clues for an interpretation in terms of NO biology. However, it cannot be excluded that rapeseed protein may affect NO production/bioavailability markers expressed in the vascular wall. Further studies are needed to specifically investigate the effects of rapeseed protein on NO biology in the vasculature.

Oxidative stress is the most important mechanism responsible for the alteration of endothelial function, and an increase in ROS production has been widely advanced to explain the impairment of vascular reactivity induced by a HFM (14,44). In human studies, antioxidants when supplemented to a HFM have been shown to prevent decreased endothelial vascular reactivity (14,45,46). In the present study, substituting rapeseed protein for milk protein alleviated the increase in plasma hydroperoxides, which are one of the first products to reflect imbalance in redox homeostasis (47,48). This effect was also observed after the HFM that included milk protein with L-arginine and L-cysteine to the same level as in rapeseed protein. Therefore, the effect of rapeseed protein on systemic generation of ROS may be ascribed to its high content in these amino acids. This is consistent with a recent study that reported that an oral supplement of a high dose of L-arginine restored endothelial function by a reduction in oxidative stress, as assessed by plasma glutathione peroxidase concentrations (49). To investigate whether circulating fraction of glutathione pool also was modulated in this study, we measured glutathione in whole blood, the major interorgan exchange pool of glutathione. The protein source of the HFM did not affect whole-blood glutathione, suggesting that the glutathione synthesis/status is not affected by the high cysteine content of rapeseed protein. However, this result does not rule out the possible modulation of the intracellular glutathione pool and redox status, in particular in the vascular wall. Interestingly, our finding of a marked reduction of the postprandial production of superoxide anions in the aorta when substituting rapeseed protein for milk protein is of particular interest with regard to vascular function. Oxidative stress in the vasculature is likely a major contributor to the decrease in vascular function and this specific action of rapeseed protein could be the reason for its marked protective effect on vascular reactivity.

In conclusion, this study shows that substituting rapeseed protein for milk protein in a HFM totally suppresses the postprandial impairment of vascular reactivity and partially decreases systemic and vascular generation of ROS. This provides the first demonstration, to our knowledge, that the nature of the protein in a HFM can have a considerable effect on the postprandial vascular dysfunction induced by high levels of saturated fat and sucrose. Future studies should further explore the potential of protein quality and specifically examine the clinical relevance of the specific protein source, such as rapeseed protein, in dietary strategies for the prevention of cardiovascular diseases, focusing on the critical postprandial period and also with medium- and long-term endpoints.

Acknowledgments

We thank Veronique Mathé, Nouredine Hafnaoui, and Anja Mitschke for their valuable contributions to the biochemical analyses.

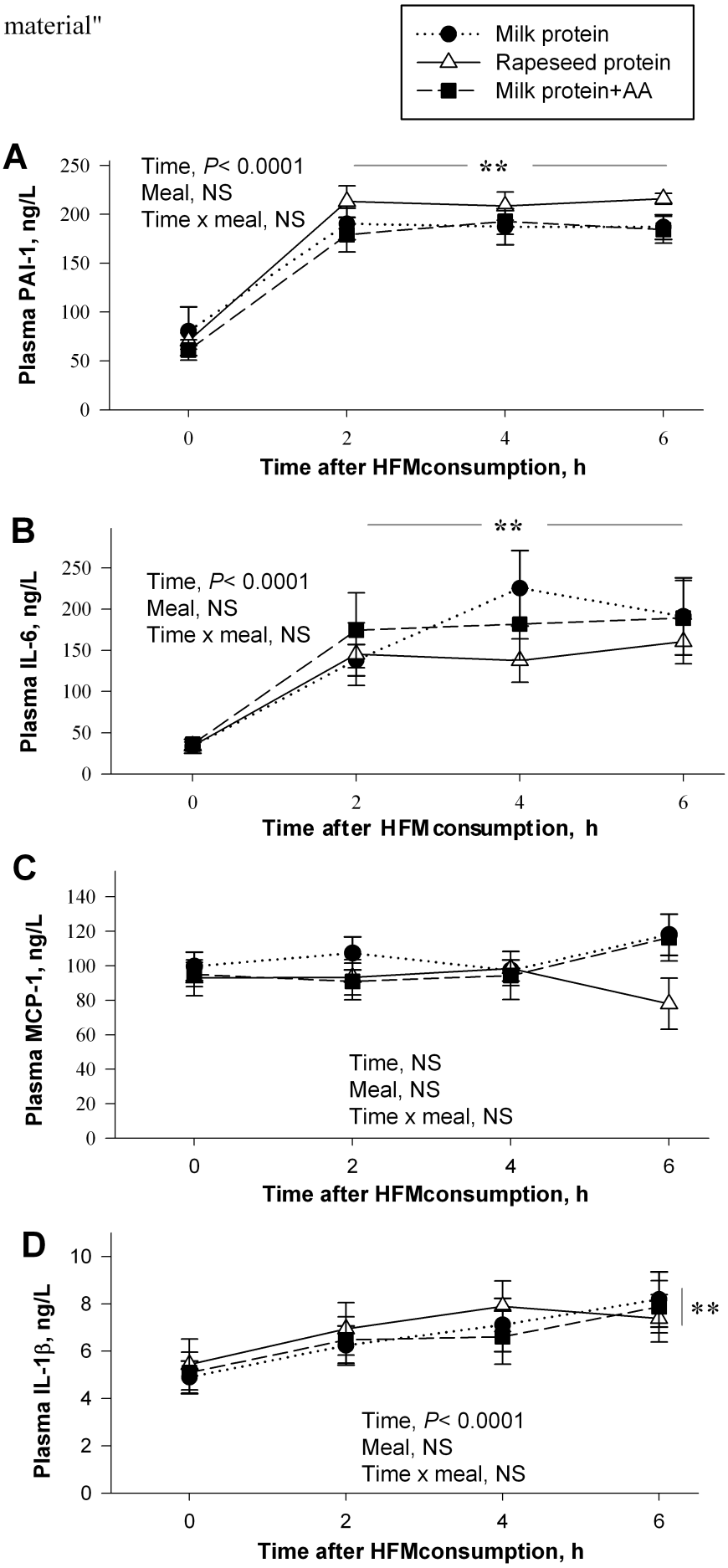
Literature Cited

1. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004;109:III27–32.
2. Juonala M, Viikari JS, Laitinen T, Marniemi J, Helenius H, Ronnemaa T, Raitakari OT. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. Circulation. 2004;110:2918–23.
3. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. J Hypertens. 2005;23:233–46.
4. O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. Am J Cardiol. 2007;100:899–904.
5. Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2003;78:S873–80.
6. Mozaffarian D, Wilson PW, Kannel WB. Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease. Circulation. 2008;117:3031–8.
7. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 2001;73:673–86.
8. Celermajer DS, Ayer JG. Childhood risk factors for adult cardiovascular disease and primary prevention in childhood. Heart. 2006;92:1701–6.
9. Poppitt SD. Postprandial lipaemia, haemostasis, inflammatory response and other emerging risk factors for cardiovascular disease: the influence of fatty meals. Curr Nutr Food Sci. 2005;1:23–34.
10. Vigna GB, Delli Gatti C, Fellin R. Endothelial function and postprandial lipemia. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2004;14:121–7.
11. de Koning EJ, Rabelink TJ. Endothelial function in the post-prandial state. Atheroscler Suppl. 2002;3:11–6.
12. Jackson KG, Armah CK, Minihane AM. Meal fatty acids and postprandial vascular reactivity. Biochem Soc Trans. 2007;35:451–3.
13. Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? Br J Nutr. 2005;93:3–9.
14. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. J Nutr. 2005;135:969–72.
15. Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. Atherosclerosis. 2002;162:1–15.
16. Gornik HL, Creager MA. Arginine and endothelial and vascular health. J Nutr. 2004;134:S2880–7; discussion 95S.
17. Siasos G, Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadi E, Stefanadis C. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? Int J Cardiol. 2007;116:300–8.
18. Borucki K, Aronica S, Starke I, Luley C, Westphal S. Addition of 2.5 g L-arginine in a fatty meal prevents the lipemia-induced endothelial dysfunction in healthy volunteers. Atherosclerosis. 2009;205:251–4.
19. Westphal S, Taneva E, Kastner S, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger S, Kropf S, Dierkes J, Luley C. Endothelial dysfunction induced by postprandial lipemia is neutralized by addition of proteins to the fatty meal. Atherosclerosis. 2006;185:313–9.
20. Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathé V, Mikogami T, Tome D, Huneau JF. Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. Free Radic Biol Med. 2007;42:1089–97.
21. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Harrison DG, Quyyumi AA. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. J Am Coll Cardiol. 2006;47:1005–11.
22. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Berot S, Evrard J, Fenart E, Tome D, Gaudichon C. The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. J Nutr. 2007;137:594–600.
23. Mariotti F, Hermier D, Sarrat C, Magne J, Fenart E, Evrard J, Tome D, Huneau JF. Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats. Br J Nutr. 2008;100:894–91.
24. Magne J, Huneau JF, Delemasure S, Rochette L, Tome D, Mariotti F. Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009

endothelial dysfunction in healthy rats. Nitric Oxide. Epub 2009 May 3.
25. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radic Biol Med. 2007;43:645–57.
26. Grau M, Hendgen-Cotta UB, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M, Kleinbongard P. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007;851:106–23.
27. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol. 1985;113:548–55.
28. Santa T, Aoyama C, Fukushima T, Imai K, Funatsu T. Suppression of thiol exchange reaction in the determination of reduced-form thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with fluorogenic benzofurazan reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate and 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. Biomed Chromatogr. 2006;20:656–61.
29. Gay C, Gebicki JM. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. Anal Biochem. 2000;284: 217–20.
30. Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. Anal Chem. 2000;72:4064–72.
31. Schwedhelm E, Tsikas D, Gutzki FM, Frolich JC. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state. Anal Biochem. 1999;276:195–203.
32. Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C, Demaison L, Rochette L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. Free Radic Biol Med. 2006;40: 2214–22.
33. Chan NN, Colhoun HM, Vallance P. Cardiovascular risk factors as determinants of endothelium-dependent and endothelium-independent vascular reactivity in the general population. J Am Coll Cardiol. 2001;38:1814–20.
34. Wu G, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. Annu Rev Nutr. 2002;22:61–86.
35. Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfuction. Biochem Soc Trans. 2007;35:466–9.
36. Magne J, Mariotti F, Fischer R, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. J Nutr Biochem. Epub 2009 Apr 8.
37. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. Free Radic Biol Med. 2006;41:691–701.
38. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. Free Radic Biol Med. 2006;40:295–302.
39. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Circ Res. 2003;93:96–105.
40. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. J Cell Physiol. 2000;184:409–20.
41. Mair J, Puschendorf B. Is measurement of cyclic guanosine monophosphate in plasma or urine suitable for assessing in vivo nitric oxide production? Circulation. 1998;97:1209–10.
42. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 2007;87:315–424.
43. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. Free Radic Biol Med. 2008;45:18–31.
44. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2008;10:1713–65.
45. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. JAMA. 1997;278:1682–6.
46. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. J Am Coll Cardiol. 2000;36:1455–60.
47. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82:47–95.
48. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res. 2005;68:26–36.
49. Lin CC, Tsai WC, Chen JY, Li YH, Lin LJ, Chen JH. Supplements of L-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress. Int J Cardiol. 2008;127:337–41.
50. Mariotti F, Tome D, Mirand PP. Converting nitrogen into protein: beyond 6.25 and Jones' factors. Crit Rev Food Sci Nutr. 2008;48:177–84.

Downloaded from jn.nutrition.org at INRA on September 3, 2009



Supplemental Figure 1: Plasma PAI-1 (A), IL-6 (B), MCP-1 (C), IL-1β (D) in healthy rats before and after ingestion of high-fat meals that contained either total milk proteins (Milk protein), rapeseed protein isolate (Rapeseed protein) or standard total milk proteins supplemented with L-cysteine and L-arginine (Milk protein+AA) up to the same level as in rapeseed protein isolate. Values are means ± SEM (n=12; cross-over design). **P<0.001 vs. baseline values.

Supplemental Table 1 Postprandial changes in plasma amino acids after ingestion of the different High-fat Meals (HFM)[1].

Plasma AA	Milk protein			Rapeseed protein			Milk protein+AA			ANOVA
	2h	4h	6h	2h	4h	6h	2h	4h	6h	Time x meal (P)
	% changes from baseline			*% changes from baseline*			*% changes from baseline*			
Taurine	-9.5 ± 4.0	-18.3 ± 1.7	-7.5 ± 10.7	-24.9 ± 6.0	14.4 ± 11.6	37.2 ± 6.5†	8.4 ± 3.5	-1.4 ± 3.6	48.9 ± 6.4††	<0.05
Aspartate	15.8 ± 10.8	-25.0 ± 11.2	-4.2 ± 7.8	-16.6 ± 3.8	36.7 ± 17.6	35.4 ± 18.7	31.5 ± 10.8	8.7 ± 12.5	37.9 ± 12.8	<0.05
Threonine	31.4 ± 5.2	35.4 ± 3.9	37.4 ± 7.6	26.5 ± 8.2	112.6 ± 18.1††	127.1 ± 9.9††	38.9 ± 3.0	21.9 ± 8.1	12.5 ± 4.8	<0.001
Serine	33.6 ± 4.6	37.3 ± 3.4	45.0 ± 8.4	8.5 ± 8.0	74.7 ± 12.3†	94.5 ± 9.8†	26.8 ± 3.4	14.3 ± 5.1	14.8 ± 6.9	<0.001
Asparagine	51.8 ± 7.3	52.2 ± 3.6	40.7 ± 8.4	30.3 ± 5.7	105.6 ± 16.7†	93.8 ± 14.0†	79.4 ± 7.7	37.0 ± 8.1	24.9 ± 4.8	<0.001
Glutamate	-15.9 ± 8.5	-36.1 ± 4.7	-26.7 ± 3.3	-17.6 ± 6.7	1.4 ± 6.6††	1.9 ± 7.3	60.2 ± 3.7††	7.2 ± 5.7	60.1 ± 12.3††	<0.001
Glutamine	25.2 ± 7.2	23.1 ± 4.6	23.4 ± 10.7	3.2 ± 8.2	53.1 ± 15.2†	66.8 ± 10.0	48.8 ± 3.6	25.9 ± 6.7	36.8 ± 7.9	<0.001
Glycine	-8.0 ± 6.8	-20.1 ± 6.0	-10.0 ± 8.1	-11.9 ± 7.8	22.6 ± 7.4††	48.3 ± 8.1††	16.7 ± 2.2	-0.1 ± 5.8	67.2 ± 10.0††	<0.001
Alanine	27.9 ± 6.9	30.8 ± 2.6	24.2 ± 7.3	1.1 ± 8.1	72.6 ± 13.9†	77.2 ± 11.2†	70.6 ± 4.7††	34.7 ± 7.2	30.4 ± 8.3	<0.001
Citrulline	5.0 ± 6.5	4.7 ± 5.0	0.2 ± 5.6	-11.8 ± 6.9	42.0 ± 15.5†	44.0 ± 10.2	46.1 ± 4.6††	26.0 ± 6.8	49.4 ± 10.0†	<0.001
Valine	49.1 ± 9.0	45.0 ± 4.5	34.8 ± 9.1	51.8 ± 11.7	121.4 ± 19.1†	87.3 ± 9.6†	77.0 ± 8.3	31.3 ± 7.7	17.2 ± 3.0	<0.001
Methionine	24.6 ± 10.2	-14.2 ± 8.7	-20.6 ± 10.2	-0.8 ± 11.6	175.1 ± 66.1†	203.0 ± 12.4†	29.0 ± 5.7	24.0 ± 18.4	86.2 ± 51.1	<0.001
Isoleucine	61.0 ± 9.1	43.9 ± 4.9	48.4 ± 9.5	51.5 ± 9.5	109.1 ± 21.4	83.1 ± 8.1	52.8 ± 7.7	20.7 ± 7.8	15.5 ± 9.0	<0.001
Leucine	66.9 ± 7.0	62.4 ± 5.7	57.0 ± 10.0	54.3 ± 11.0	114.2 ± 19.3	80.1 ± 8.6	66.4 ± 7.8	34.9 ± 8.3	13.8 ± 6.5†	<0.001
Tyrosine	6.4 ± 7.4	10.7 ± 6.7	14.0 ± 8.1	3.2 ± 12.7	-2.2 ± 8.1	-20.1 ± 5.7	91.9 ± 9.3††	34.4 ± 7.3	46.5 ± 11.9	<0.001
Phenylalanine	42.2 ± 9.1	31.1 ± 4.5	21.5 ± 10.3	12.9 ± 8.4†	72.9 ± 15.6††	65.0 ± 6.5	44.2 ± 4.6	15.4 ± 5.1	21.9 ± 5.6	<0.001
Histidine	27.8 ± 7.6	27.9 ± 6.2	31.9 ± 10.7	23.4 ± 10.1	99.7 ± 16.3††	102.6 ± 12.5††	50.9 ± 4.0	24.5 ± 8.4	15.2 ± 3.7	<0.001
Tryptophan	16.2 ± 10.3	2.8 ± 4.2	-2.4 ± 6.2	17.9 ± 8.2	69.0 ± 18.3††	75.6 ± 10.8††	76.1 ± 3.5††	23.8 ± 6.3	44.8 ± 9.7	<0.001
Ornithine	-3.6 ± 18.3	-23.3 ± 4.4	-13.4 ± 11.2	38.9 ± 10.1	119.7 ± 31.6††	71.2 ± 8.2††	79.2 ± 28.2†	14.1 ± 23.4	-6.0 ± 4.7	<0.001
Lysine	26.5 ± 8.2	22.7 ± 5.0	36.9 ± 10.4	-5.3 ± 7.5	21.2 ± 8.7	36.4 ± 8.5	28.1 ± 4.1	9.1 ± 5.6	20.9 ± 5.5	<0.001
Proline	71.6 ± 7.9	101.6 ± 5.1	101.2 ± 15.6	25.9 ± 7.8††	130.2 ± 19.4	146.2 ± 12.3	48.4 ± 6.2	32.8 ± 9.1	-23.7 ± 5.7††	<0.001

[1]Values are means ± SEM (n=6; cross-over design). †*P*<0.05, ††*P*<0.001 vs. milk protein HFM.

CHAPITRE 4 : DYSFONCTION ENDOTHELIALE INDUITE PAR UNE SURCHARGE EN METHIONINE : HYPERHOMOCYSTEINEMIE EXPERIMENTALE

Article 4: Vascular endothelial dysfunction in experimental post-methionine loading, hyperhomocysteinemia: mechanistic insights from a rat model

Joëlle Magné, François Mariotti, Didier Borderie, Véronique Mathé, Cécile Bos et Jean François Huneau

Introduction et objectifs

Au cours de ces vingt dernières années, l'hyperhomocystéinémie a émergé comme un facteur de risque cardiovasculaire (Andreotti *et al.* 2000; Durand *et al.* 2001; Lentz et Haynes 2004). Ainsi, il a été montré qu'une augmentation modérée de l'homocystéine plasmatique était observée chez des sujets à risque et atteints de maladies cardiovasculaires et pouvait prédire la survenue d'évènements athérothrombotiques (De Bree et al. 2002; Zylberstein et al. 2004; Casas et al. 2005; Boger et al. 2009). Cependant, très récemment, des études d'intervention ne parviennent pas à montrer un bénéfique d'une réduction de l'hyperhomocystéinémie, par une supplémentation en folates, sur le risque de survenue pathologies athérothrombotiques, ne permettant pas de confirmer par cette approche la causalité de l'hyperhomocystéinémie dans le risque cardiovasculaire (Toole et al. 2004; den Heijer et al. 2007; Jamison et al. 2007). En outre, bien que la production de ROS semble étroitement associée à l'hyperhomocystéinémie, les mécanismes impliqués dans l'établissement d'anomalies vasculaires restent largement discutés (Lentz 2005; Dayal et Lentz 2007).

De nombreuses études chez l'homme et chez l'animal ont démontré que l'induction d'une hyperhomocystéinémie modérée par l'ingestion d'une surcharge en méthionine et/ou d'une déficience en folates en aigu et en chronique provoquait une altération de la réactivité vasculaire, caractérisant une dysfonction endothéliale (Bellamy *et al.* 1998; Chambers *et al.* 1999; Hanratty *et al.* 2001b). C'est ainsi que l'hyperhomocystéinémie expérimentale aiguë a été largement isolée afin d'examiner des effets plus spécifiques de l'homocystéine sur les fonctions vasculaires. Certaines de ces études ont rapporté que la dysfonction endothéliale induite par une charge orale en méthionine, était étroitement associée à une augmentation des concentrations plasmatiques en ADMA, inhibiteur endogène de la synthèse du NO (Boger et al. 2000; Boger et al. 2001; Stuhlinger et al. 2003; Fu et al. 2005), suggérant son implication

dans l'initiation d'altérations de la fonction endothéliale vasculaire induite par une hyperhomocystéinémie modéré (Boger 2003; Lentz *et al.* 2003; Vallance et Leiper 2004). En Parallèle, des études *in vitro* sur cellules endothéliales en culture ont montré que l'hyperhomocystéinémie induisait directement une inhibition de l'expression de la diméthylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), enzyme du catabolisme de l'ADMA, expliquant alors l'augmentation de l'ADMA observée (Stuhlinger et al. 2001; Vallance 2001; Dayal et al. 2008). En outre, l'équipe d'Antoniades a observé une élévation des concentrations plasmatiques d'ADMA uniquement chez des sujets dont l'hyperhomocystéinémie était provoquée de façon aiguë (hyperhomocystéinémie exprimentale) et non chez ceux présentant une hyperhomocystéinémie chronique isolée (Antoniades et al. 2006). Comme la voie de synthèse de l'ADMA à partir de réactions de transfert de groupement méthyles semble intimement liée au métabolisme de la méthionine, ces travaux émettaient l'hypothèse que seule l'hyperhomocystéinémie aiguë induite par une charge en méthionine était susceptible de moduler en aigu les concentrations plasmatiques en ADMA. A l'opposé, en situation d'hyperhomocystéinémie chronique, l'ADMA, dont les concentrations restent stables, ne pourrait pas être impliquée dans les effets délétères de l'hyperhomocystéinémie. (Antoniades et al. 2006). De façon intéressante, l'étude de Dayal est venue corroborer cette hypothèse en rapportant chez des souris saines que l'ingestion d'un régime riche en méthionine et déficient en folates pendant 10 mois, induisait une hyperhomocystéinémie modérée associée à une altération de la réactivité vasculaire et une diminution de l'expression hépatique de DDAH sans cependant d'altération des concentrations plasmatiques en ADMA (Dayal et al. 2008). Cependant, il est intéressant de souligner que d'autres études chez l'homme n'ont pas associé de variations de concentrations plasmatiques d'ADMA à une dysfonction endothéliale induite par une surcharge en méthionine ou en homocystéine en aiguë (Wanby et al. 2003; Doshi et al. 2005; Mariotti et al. 2006). Par conséquent, le rôle joué par l'ADMA dans l'initiation de la dysfonction endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie reste largement discuté.

C'est pour cela que dans cette étude, nous avons voulu examiner chez des rats sains le métabolisme de l'ADMA dans un modèle de dysfonction endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie aiguë provoquée par une surcharge en méthionine. Nous nous sommes principalement intéressés aux DDAH, enzymes du catabolisme de l'ADMA et aux voies de protéolyse, impliqué dans la libération de l'ADMA.

Matériels et méthodes

Chez des rats Wistar-kyoto (9 semaines), nous avons étudié la réactivité vasculaire NO-dépendante avant, puis 2, 4 et 6h après le test de charge en méthionine de 300mg/ rat (n=10) ou une charge en eau (véhicule, n=6), et nous avons réalisé des prélèvements sanguins afin d'évaluer au niveau plasmatique l'homocystéine totale, l'ADMA (par ELISA) , les hydroperoxydes (par la méthode FOX) et l'homocystéine réduite, la cystéine réduite et le glutathion réduit plasmatiques (par HPLC).

Le sacrifice de 16 rats a été réalisé 6 h après les deux tests expérimentaux afin de prélever l'aorte abdominale et le foie pour déterminer l'activité hépatique de DDAH-1 et analyser l'expression aortique des transcrits codant pour la DDAH-1 et celle des transcrits codant pour DDAH-1, la cathepsine D, la cathepsine E2 et l'ubiquitine dans le foie, par RT-PCR quantitative.

Les statistiques élémentaires sont rapportées sous la forme de moyenne ± erreur type. Les données ont été analysées en utilisant un modèle mixte pour données répétées (procédure Mixed, SAS). Des comparaisons multiples ont été réalisées par la construction de contrastes *ad hoc* sous le modèle mixte. Pour l'analyse de l'expression des gènes, la comparaison des moyennes a été réalisée en utilisant un test t de student. La significativité statistique est considérée au seuil de 5%.

Résultats

Comme attendu, une diminution significative de la réactivité vasculaire (Figure 1), d'environ 30%, a été constatée à 4 et 6h après l'administration de la surcharge en méthionine, par rapport à celle mesurée avant le test de charge. Comparées à celle testée après la charge en eau, la réactivité vasculaire est significativement plus faible, après l'ingestion de la surcharge en méthionine (effet repas*temps, P<0,001).

Deux heures après l'ingestion, la charge en méthionine a induit une augmentation des concentrations en homocystéine totale plasmatique (de 2,0±0.3 avant le repas à 21,3±2,9µM 6h après le repas, *P*<0,0001) et une augmentation de l'homocystéine réduite (Figure 2A, *P*<0,0001) par rapport à la valeur basale. Cette hyperhomocystéinémie perdure 6h après l'administration de methionine. Aucune variation significative de la cystéine réduite (Figure 2B) et du glutathion réduit (Figure 2C) n'a été observée après les deux tests expérimentaux.

Les concentrations plasmatiques d'ADMA (Figure 3) ont diminué d'environ 20%, 2h et 4h après l'administration de la charge en méthionine, par comparaison aux valeurs avant

ingestion. Comparées à celles mesurées après le véhicule, les concentrations plasmatiques en ADMA sont significativement plus faibles après la surcharge en méthionine (interaction repas-temps, P<0,001).

Six heures après l'administration de la surcharge en méthionine, l'expression hépatique des ARN codant pour la DDAH-1 (Figure 4A) était significativement plus faible qu'après une charge en eau. Aucune variation significative de l'expression aortique des ARN codant DDAH-2 (Figure 4B) n'a été observée après les deux tests expérimentaux.

Six heures la surcharge en méthionine, les expressions hépatiques des ARN codant pour la cathepsine D (Figure 5A) et de l'ubiquitine (Figure 5B) mais pas pour la cathepsine E2 (Figure 5C) étaient significativement plus faibles par rapport à celles mesurées après le véhicule.

Discussion et conclusion

Le résultat majeur de cette étude est que la dysfonction endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie aiguë provoquée par une surcharge en méthionine n'est pas associée à une augmentation de l'ADMA plasmatique chez le rat sain. En effet, l'ADMA est considéré comme un marqueur de l'inhibition de la NO synthase et une abondante littérature a associé une augmentation des concentrations plasmatique à un risque cardiovasculaire et diabétique (Boger 2003; Lentz *et al.* 2003; Vallance et Leiper 2004).

De façon surprenante, nos résultats montrent, au contraire, une diminution significative des concentrations plasmatiques en ADMA après la surcharge en méthionine. Ces résultats montrent que l'ADMA plasmatique ne peut pas expliquer la dysfonction endothéliale induite par une hyperhomocystéinémie aiguë chez le rat sain. Cependant, l'observation d'une diminution de l'ADMA au niveau plasmatique ne permet pas, pour autant, d'écarter totalement l'implication de l'ADMA, dans l'initiation de la dysfonction endothéliale vasculaire. En effet, vu la compartimentation de l'ADMA et l'activité NO synthase au niveau vasculaire (Vallance et Leiper 2004), il est possible que les concentrations circulantes ne reflètent pas les concentrations en ADMA dans le compartiment de synthèse de NO.

Par ailleurs, ce résultat contredit l'hypothèse selon laquelle l'administration d'une surcharge en méthionine stimule automatiquement la synthèse de l'ADMA, via une activation de la méthylation des résidus d'arginine protéique (Antoniades et al. 2006). Afin de mieux appréhender la modulation du métabolisme de l'ADMA en situation d'hyperhomocystéinémie induite par une charge en méthionine, nous avons examiné l'expression des enzymes

impliquées dans les voies de production et de dégradation de l'ADMA. Tout d'abord, nous avons observé une diminution de l'expression hépatique de la DDAH-1, isoforme dominante au niveau hépatique de l'enzyme responsable du catabolisme de l'ADMA. Des études *in vitro* ont démontré que l'homocystéine pouvait directement inhiber l'activité DDAH, par des mécanismes d'oxydation des résidus cystéines contenus au niveau du site actif de l'enzyme (Stuhlinger et al. 2001; Dayoub et al. 2003; Dayal et al. 2008). En effet, l'homocystéine contient un groupement thiol très réactif, capable d'interagir avec des résidus cystéines protéique, altérant ainsi la fonctionnalité de ces protéines. Par conséquent, la réduction de l'ADMA plasmatique observée après la charge en méthionine ne semble pas pouvoir être expliquée par une activation du catabolisme de l'ADMA, puisque, au contraire, les résultats suggèrent une inhibition de la voie de catabolisme. Afin de confirmer cette hypothèse, une évaluation de l'activité DDAH, au niveau hépatique, est en cours.

Par ailleurs, comme la synthèse de l'ADMA résulte principalement de la protéolyse de protéines contenant des résidus méthylarginines, nous avons examiné la transcription hépatique de trois protéines impliquées dans la protéolyse (Vallance et Leiper 2004). A notre connaissance, cette étude est la première à rapporter qu'une hyperhomocystéinémie aiguë provoquée par une surcharge en méthionine induit une diminution de l'expression hépatique de l'ubiquitine, indiquant ainsi une inhibition du système intracellulaire de protéolyse, ubiquitine-protéasome. En outre, nous avons également observé une diminution de l'expression hépatique de la cathepsine D, protéase impliquée dans le système de protéolyse lysosomiale (Zaidi et al. 2008). Bien que nous ne sommes pas en mesure de prouver que ces systèmes de protéolyse soient orientés spécifiquement vers une dégradation des protéines contenant des résidus méthylarginine, ces résultats indiquent une diminution globale des réactions de protéolyse. En étant que conscient que cette étude n'apporte pas tous les éléments permettant d'évaluer le bilan des voies de synthèse et de dégradation de l'ADMA, ces résultats permettent de proposer l'hypothèse suivante : la réduction de l'ADMA plasmatique observée après l'administration de la surcharge en méthionine est largement déterminée par l'inhibition de la protéolyse. De nombreuses études restent à réaliser afin de mieux comprendre les phénomènes de contrôle de la synthèse de l'ADMA et des voies de la protéolyse en situation d'hyperhomocystéinémie aiguë.

Légendes de figures

Figure 1 : Réactivité vasculaire endothélium-dépendant, évaluée par la diminution de la pression artérielle moyenne induite par l'injection intraveineuse de 20µg/kg d'acétylcholine, avant, 2, 4 et 6h après l'ingestion d'une charge orale en méthionine ou du véhicule (eau). Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne ± erreur type. *P<0.05 vs. Véhicule.

Figure 2: Homocystéine (A), cysteine (B) et glutathion (C) réduits plasmatiques mesurés avant, 2, 4 et 6h après l'ingestion d'une charge orale en méthionine ou du véhicule (eau). **P<0.001 vs. Véhicule.

Figure 3 : ADMA plasmatique mesuré avant, 2, 4 et 6h après l'ingestion d'une charge orale en méthionine ou du véhicule (eau). *P<0.05 vs. Véhicule.

Figure 4 : Expression de la DDAH-1 au niveau du foie et de la DDAH-2 au niveau de l'aorte abdominale, prélevée 6h après l'ingestion d'une charge orale en méthionine ou du véhicule (eau). *P<0.05 vs. Véhicule.

Figure 5 : Expression de la Cathepsine D, Cathepsine E2, et de l'Ubiquitine au niveau du foie prélevé 6h après l'ingestion d'une charge orale en méthionine ou du véhicule (eau). *P<0.05, **P<0.001 vs. Véhicule.

Figure 1

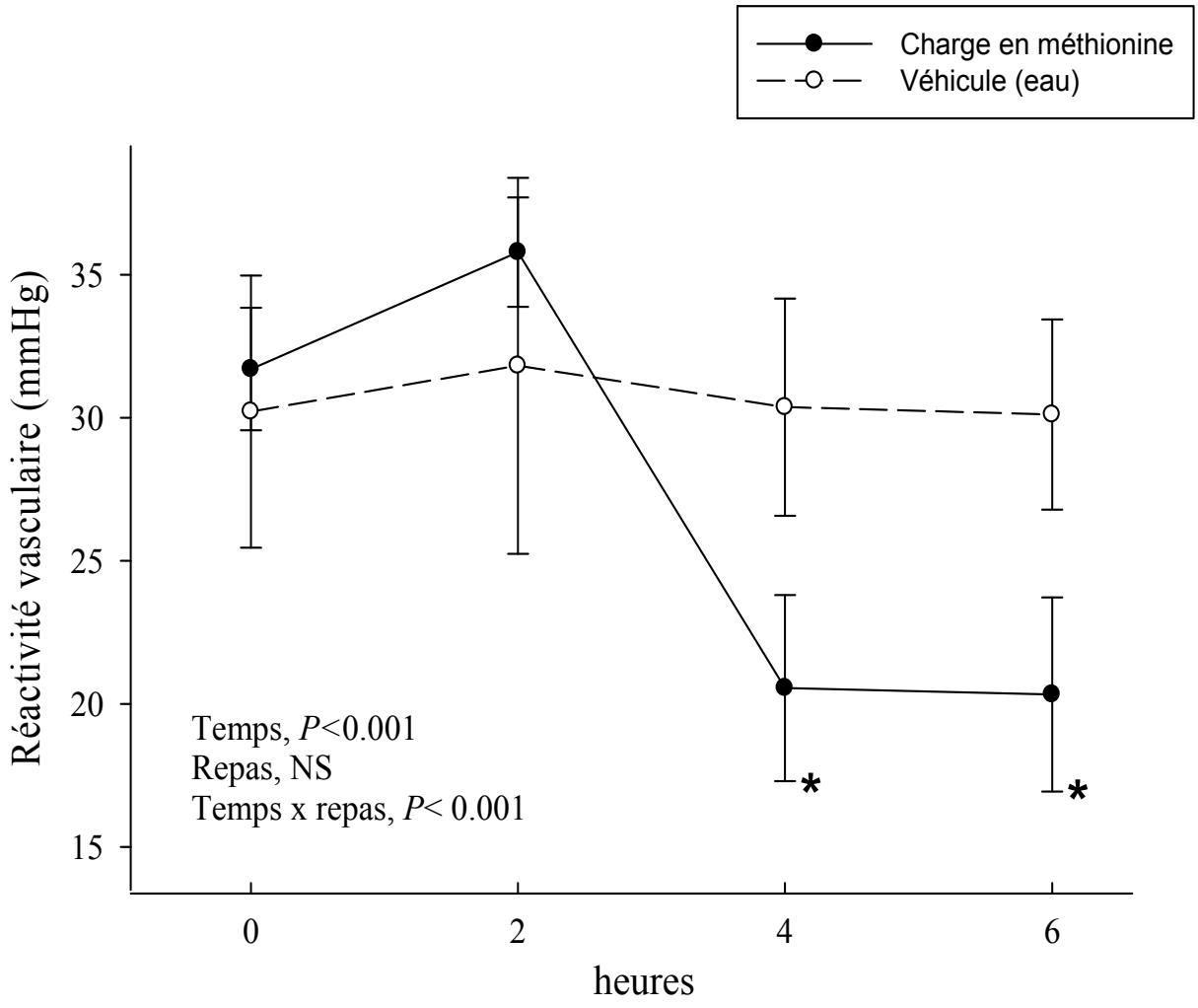

Charge en méthionine
Véhicule (eau)
Réactivité vasculaire (mmHg)
35
30
25
20
15
Temps, P<0.001
Repas, NS
Temps x repas, P< 0.001
*
*
0
2
4
6
heures

Figure 2

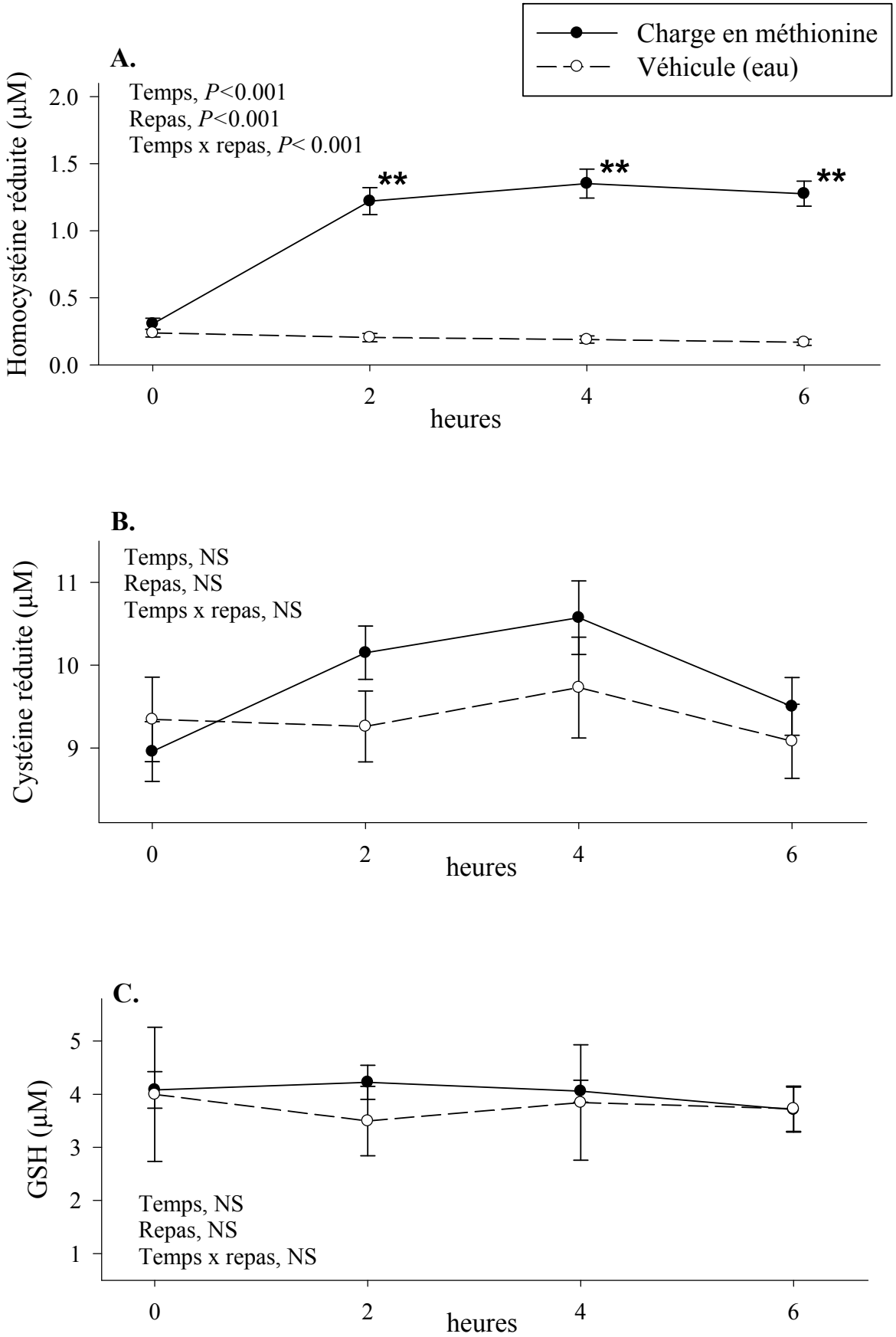

Charge en méthionine
Véhicule (eau)
A.
Temps, P<0.001
Repas, P<0.001
Temps x repas, P< 0.001
Homocystéine réduite (µM)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
0
2
4
6
heures
B.
Temps, NS
Repas, NS
Temps x repas, NS
Cystéine réduite (µM)
11
10
9
0
2
4
6
heures
C.
GSH (µM)
5
4
3
2
1
Temps, NS
Repas, NS
Temps x repas, NS
0
2
4
6
heures

Figure 3

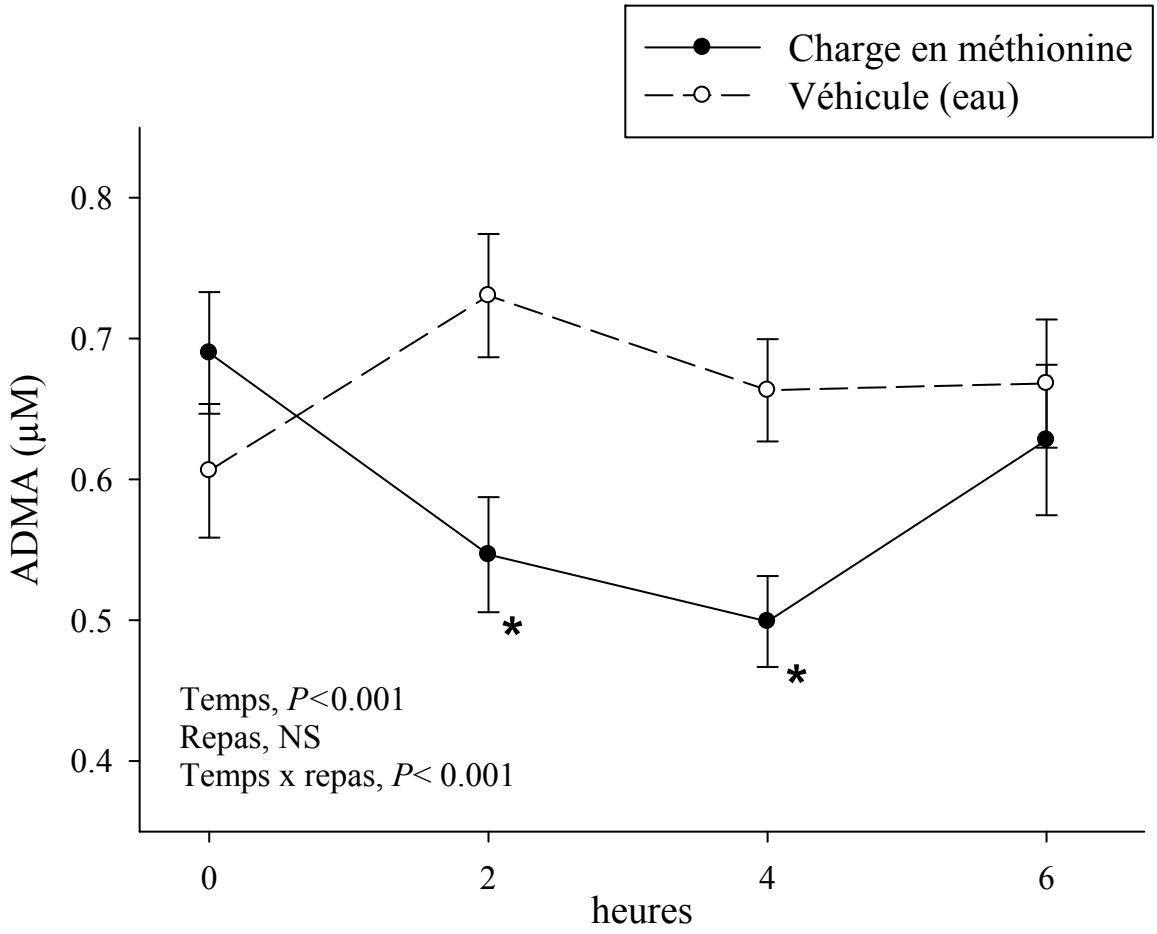

Charge en méthionine
Véhicule (eau)
ADMA (µM)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
*
*
Temps, P<0.001
Repas, NS
Temps x repas, P< 0.001
0
2
4
6
heures

Figure 4

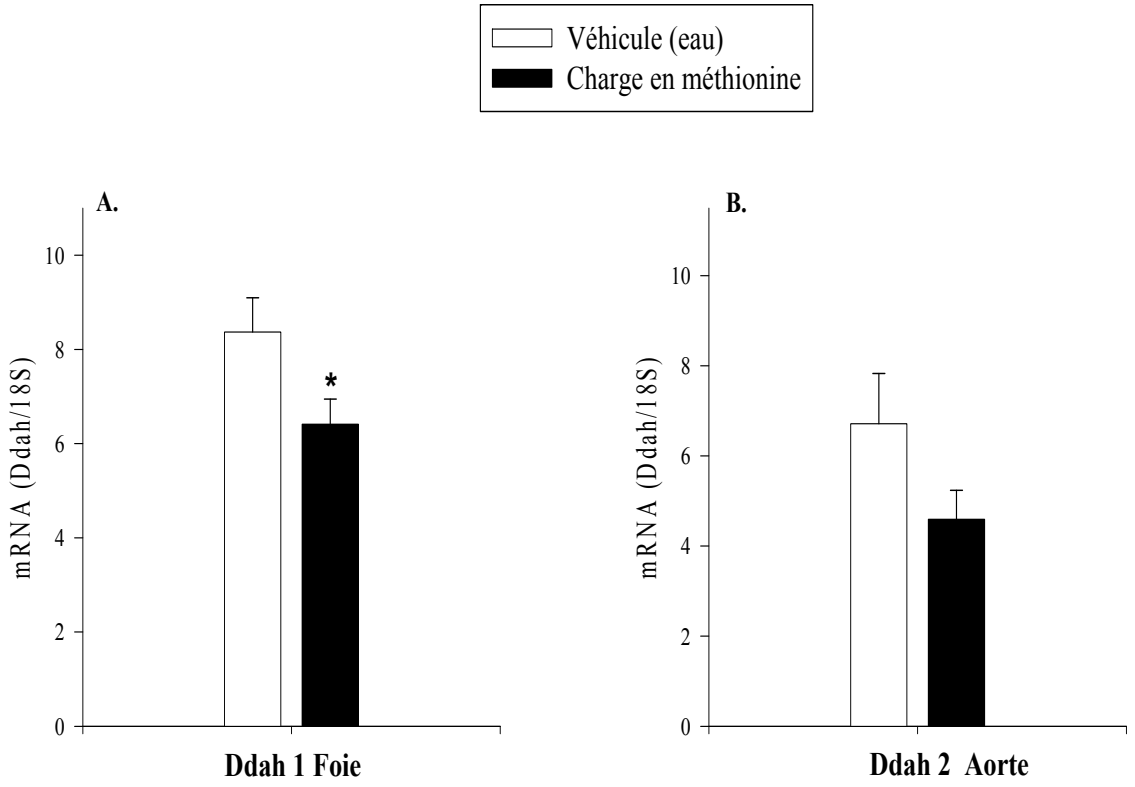
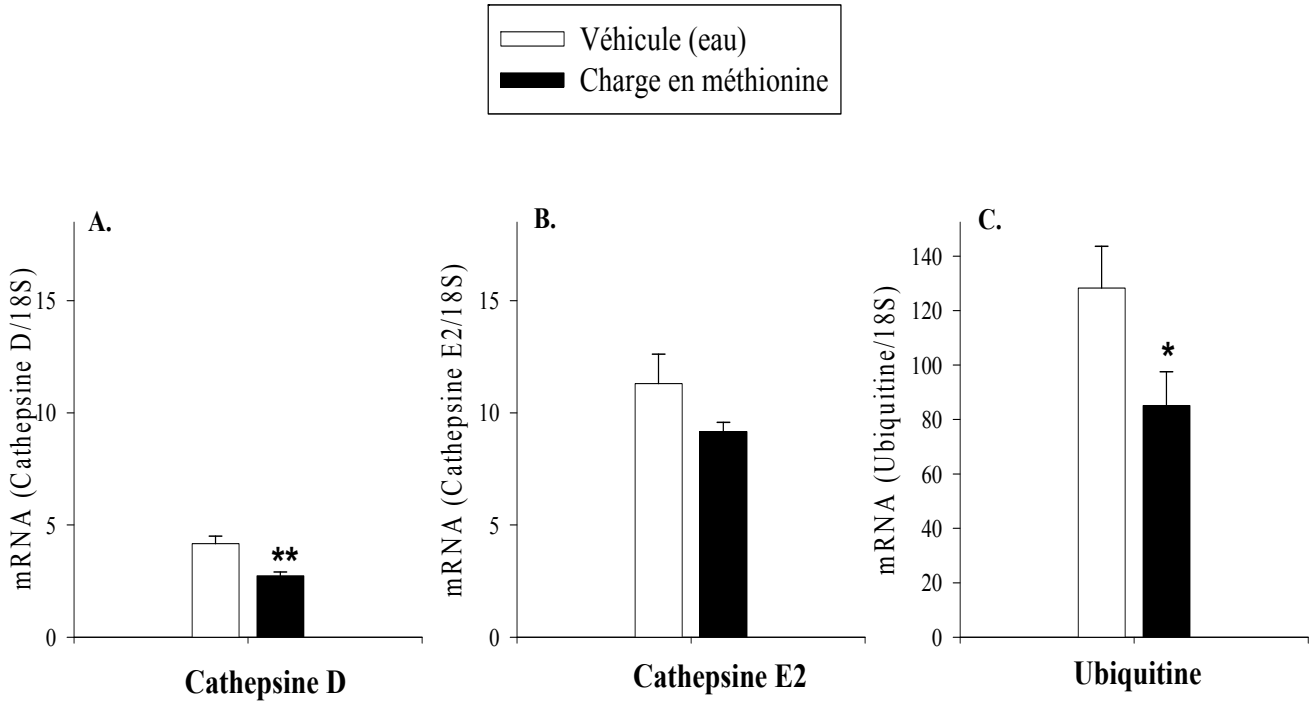


Figure 5



Bibliographie

[1] Andreotti, F., Burzotta, F., Manzoli, A. and Robinson, K., Homocysteine and risk of cardiovascular disease, J Thromb Thrombolysis, 2000, 9: 13-21.
[2] Durand, P., Prost, M., Loreau, N., Lussier-Cacan, S. and Blache, D., Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease, Lab Invest, 2001, 81: 645-672.
[3] Lentz, S. R. and Haynes, W. G., Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor?, Cleve Clin J Med, 2004, 71: 729-734.
[4] Casas, J. P., Bautista, L. E., Smeeth, L., Sharma, P. and Hingorani, A. D., Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation, The Lancet, 2005, 365: 224-232.
[5] De Bree, A., Verschuren, W. M., Kromhout, D., Kluijtmans, L. A. and Blom, H. J., Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease, Pharmacol Rev, 2002, 54: 599-618.
[6] Zylberstein, D. E., Bengtsson, C., Bjorkelund, C., Landaas, S., Sundh, V., Thelle, D. and Lissner, L., Serum homocysteine in relation to mortality and morbidity from coronary heart disease: a 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg, Circulation, 2004, 109: 601-606.
[7] Boger, R. H., Sullivan, L. M., Schwedhelm, E., Wang, T. J., Maas, R., Benjamin, E. J., Schulze, F., Xanthakis, V., Benndorf, R. A. and Vasan, R. S., Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community, Circulation, 2009, 119: 1592-1600.
[8] den Heijer, M., Willems, H. P., Blom, H. J., Gerrits, W. B., Cattaneo, M., Eichinger, S., Rosendaal, F. R. and Bos, G. M., Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial, Blood, 2007, 109: 139-144.
[9] Jamison, R. L., Hartigan, P., Kaufman, J. S., Goldfarb, D. S., Warren, S. R., Guarino, P. D. and Gaziano, J. M., Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease: a randomized controlled trial, Jama, 2007, 298: 1163-1170.
[10] Toole, J. F., Malinow, M. R., Chambless, L. E., Spence, J. D., Pettigrew, L. C., Howard, V. J., Sides, E. G., Wang, C. H. and Stampfer, M., Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial, Jama, 2004, 291: 565-575.
[11] Dayal, S. and Lentz, S. R., Role of redox reactions in the vascular phenotype of hyperhomocysteinemic animals, Antioxid Redox Signal, 2007, 9: 1899-1909.
[12] Lentz, S. R., Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis, J Thromb Haemost, 2005, 3: 1646-1654.
[13] Bellamy, M. F., McDowell, I. F., Ramsey, M. W., Brownlee, M., Bones, C., Newcombe, R. G. and Lewis, M. J., Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults, Circulation, 1998, 98: 1848-1852.
[14] Chambers, J. C., Obeid, O. A. and Kooner, J. S., Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 2922-2927.
[15] Hanratty, C. G., McGrath, L. T., McAuley, D. F., Young, I. S. and Johnston, D. G., The effect on endothelial function of vitamin C during methionine induced hyperhomocysteinaemia, BMC Cardiovasc Disord, 2001, 1: 1.

[16] Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Sydow, K., Heistad, D. D. and Lentz, S. R., Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20: 1557-1564.
[17] Boger, R. H., Lentz, S. R., Bode-Boger, S. M., Knapp, H. R. and Haynes, W. G., Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans, Clin Sci (Lond), 2001, 100: 161-167.
[18] Fu, Y. F., Xiong, Y. and Guo, Z., A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats, Eur J Pharmacol, 2005, 508: 167-175.
[19] Stuhlinger, M. C., Oka, R. K., Graf, E. E., Schmolzer, I., Upson, B. M., Kapoor, O., Szuba, A., Malinow, M. R., Wascher, T. C., Pachinger, O. and Cooke, J. P., Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine, Circulation, 2003, 108: 933-938.
[20] Boger, R. H., The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor, Cardiovasc Res, 2003, 59: 824-833.
[21] Lentz, S. R., Rodionov, R. N. and Dayal, S., Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA, Atheroscler Suppl, 2003, 4: 61-65.
[22] Vallance, P. and Leiper, J., Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24: 1023-1030.
[23] Stuhlinger, M. C., Tsao, P. S., Her, J. H., Kimoto, M., Balint, R. F. and Cooke, J. P., Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine, Circulation, 2001, 104: 2569-2575.
[24] Vallance, P., Comment: the asymmetrical dimethylarginine/dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway in the regulation of nitric oxide generation, Clin Sci (Lond), 2001, 100: 159-160.
[25] Dayal, S., Rodionov, R. N., Arning, E., Bottiglieri, T., Kimoto, M., Murry, D. J., Cooke, J. P., Faraci, F. M. and Lentz, S. R., Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295: H816-825.
[26] Antoniades, C., Tousoulis, D., Marinou, K., Vasiliadou, C., Tentolouris, C., Bouras, G., Pitsavos, C. and Stefanadis, C., Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines, Am J Clin Nutr, 2006, 84: 781-788.
[27] Doshi, S., McDowell, I., Goodfellow, J., Stabler, S., Boger, R., Allen, R., Newcombe, R., Lewis, M. and Moat, S., Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia, Metabolism, 2005, 54: 351-360.
[28] Wanby, P., Brattstrom, L., Brudin, L., Hultberg, B. and Teerlink, T., Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading, Scand J Clin Lab Invest, 2003, 63: 347-353.
[29] Mariotti, F., Hammiche, A., Blouet, C., Dare, S., Tome, D. and Huneau, J. F., Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline, Eur J Nutr, 2006, 45: 383-390.
[30] Dayoub, H., Achan, V., Adimoolam, S., Jacobi, J., Stuehlinger, M. C., Wang, B. Y., Tsao, P. S., Kimoto, M., Vallance, P., Patterson, A. J. and Cooke, J. P., Dimethylarginine

dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence, Circulation, 2003, 108: 3042-3047.
[31] Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S. and Kalbacher, H., Cathepsin D: a cellular roadmap, Biochem Biophys Res Commun, 2008, 376: 5-9.

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

Au terme du travail expérimental de cette thèse, si certains processus impliqués dans l'apparition de la dysfonction endothéliale, induite de façon aiguë, ont été mis en évidence, la caractérisation d'un modèle animal de dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas hyperlipidique et la réduction de ce phénotype pro-athérogène par une modulation de la fraction protéique du repas, nous semblent deux résultats originaux particulièrement interessant dans une perspective de recherche clinique et d'études plus mécanistiques de la dysfonction endothéliale postprandiale.

En effet, il ressort très clairement des différents travaux expérimentaux que nous avons réalisés un solide modèle de dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain, caractérisé par la triade de dérégulations métaboliques rapportées dans la littérature: diminution de la réactivité vasculaire, inflammation à bas bruit et augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène à un niveau systémique et vasculaire. Bien que les cinétiques d'apparitions de ces évènements indésirables varient légèrement d'une série de rats à l'autre (augmentation des marqueurs proinflammatoires transitoire ou prolongée pendant la phase postprandiale), les amplitudes des effets délétères sont très significatives et demeurent cohérentes d'une expérience à l'autre. D'une façon globale, les paramètres caractérisés de la dysfonction endothéliale postprandiale sont tout à fait reproductibles. Dans ces conditions, nous pouvons proposer l'utilisation de ce modèle animal de dysfonction endothéliale comme un outil exploratoire dans différentes contextes de traitements nutritionnels et/ou pharmacologiques de l'altération aiguë de la fonction endothéliale vasculaire. Il est à noter que l'utilisation d'un modèle chez l'animal permet bien sûr des explorations plus faciles, et qu'en outre elle permet d'obtenir chez l'animal des données complémentaires qui ne sont pas accessibles chez l'Homme.
A ce titre, il est intéressant de noter que lors de ce travail de thèse, nous avons également validé l'utilisation du test de réactivité vasculaire dans la mesure où nous avons démontré qu'il permettait la détection d'altérations de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans une condition autre que l'induction d'un repas hyperlipidique, le modèle d'hyperhomocystéinémie provoquée par une surcharge en méthionine. Cependant, au regard de la lourdeur méthodologique imposé par ce test de réactivité vasculaire, inhérente notamment à la mesure de pression artérielle chez le rat par pléthysmographie, qui requière la contention de l'animal et nécessite de longues séances d'habituation, nous suggérons pour

l'avenir l'utilisation de techniques de mesure de la pression artérielle par télémétrie, plus confortable pour l'animal et l'expérimentateur.

Par ailleurs, tout en conservant l'approche intégrée que permet ce modèle de dysfonction endothéliale induite par un repas riche en acides gras saturés et en saccharose, nous avons précisé deux mécanismes importants dans l'apparition de l'altération postprandiale des fonctions endothéliales vasculaires : la diminution postprandiale de la production du NO et l'activation précoce de la voie de signalisation inflammatoire dans le tissu adipeux. Avec une grande précision méthodologique, ces résultats viennent confirmer des hypothèses qu'on pouvait légitimement formuler à la lecture des nombreuses études chez l'homme et chez l'animal de la dysfonction endothéliale induite par un test de charge hyperlipidique. Cependant, au regard de l'influence du NO, molécule clé dans l'homéostasie vasculaire, et du tissu adipeux, source majeur de cytokines proinflammatoires, dans la régulation de nombreuses voies de signalisation de l'organisme, nous pouvons considérer que nos résultats peuvent servir de base nécessaire à des études plus mécanistique de la dysfonction endothéliale postprandiale. En effet, nous pensons que l'observation d'une diminution de production du NO serait plutôt expliqué par une diminution de l'activité de la NOS endothéliale. Etant donné le stress oxydant vasculaire observé au niveau vasculaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation postprandiale de la production de ROS serait en faveur d'une oxydation de la BH_4, cofacteur de la NOS. Ainsi, une évaluation plus fine de découplage de la NOS et plus particulièrement de la biodisponibilité vasculaire de la BH_4, nous semble particulièrement intéressante à analyser dans la situation postprandiale. A ce titre, il nous semble également tout à fait pertinent d'examiner d'autres acteurs de la voie de signalisation Arginine-NO qui peuvent jouer un rôle important dans l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale, tels la modulation des concentrations de l'ADMA au niveau vasculaire ou en encore l'activité enzymatique de la guanylate cyclase soluble. L'étude de ces paramètres est assez facilement envisageable chez le rat, tout comme l'utilisation de conditions pharmacologiques expérimentales pour explorer l'implication de certains mécanismes.

A ce stade, il nous semble intéressant de revenir sur un résultat que nous n'attendions pas. Bien que nous ayons démontré de la façon la plus directe et specifique, lors d'une expérience en dispositif croisé, que le repas hyperlipidique induisait une diminution de la production corps-entier du NO, lors d'une troisième expérience, nous n'avons pas observé de variations significatives des nitrites plasmatiques, alors qu'ils sont considérés comme le marqueur

plasmatique de la production du NO. Au regard de la littérature n'ayant rapporté aucune variation des nitrites pendant la situation postprandiale, nous avons supposé que les nitrites au niveau plasmatique ne serait probablement pas un bon marqueur d'une diminution de la production du NO, dans cette situation aigüe particulière. Cette hypothèse reste à confirmer par d'autres études dans différentes conditions d'altération aiguë de la production du NO. Au regard des récentes études biochimiques ayant montré une compartimentation des nitrites au niveau systémique, il serait intéressant de considérer l'impact du pool érythrocytaire de nitrites dans l'apparition de la dysfonction endothéliale postprandiale.
Dans ce contexte de stress oxydant et d'altération de la production du NO caractérisés, nous pensons que l'activation de NF-κB dans le tissu adipeux viscéral ouvre le champ à de nombreuses études de la régulation de l'activité de ce facteur de transcription, en aigu. En effet, des études *in vitro* ont montré que des réactions de nitrosylation et de glutathionylation sont autant de phénomènes impliqués dans le contrôle de l'activité de NF-κB. Ainsi, il serait intéressant d'examiner, pendant la phase postprandiale, ces différentes réactions de contrôle des voies de signalisation inflammatoire, ainsi que les sous-types cellulaires du tissu adipeux viscéral directement impliqués dans cette inflammation à bas bruit postprandiale. Plus généralement, cette dysfonction endothéliale postprandiale caractérisée chez le rat sain nous apparait comme un exemple particulièrement intéressant de phénotype pro-athérogène induit de façon aigu, qui pourrait être mis à profit pour un examen plus fin de l'apparition de phénomènes clé dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

Par ailleurs, la mise en évidence d'un effet protecteur de la fraction protéique de colza à dose nutritionnelle sur la fonction endothéliale vasculaire, est un résultat prometteur en faveur d'une utilisation de ces protéines de colza en alimentation humaine. Au vu des résultats obtenus après adjonction de cystéine et arginine à des protéines de lait, la richesse des protéines de colza en ces deux acides aminés, qui fondait notre intérêt pour ces protéines, semble pouvoir expliquer en partie leur effet bénéfique sur la dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas gras et sucré. Les mécanismes restent cependant encore largement spéculatifs. En effet, bien que nous ayons montré que la substitution des protéines de lait du repas hyperlipidique par des protéines de colza induisait une réduction totale de l'altération postprandiale de la réactivité vasculaire, aucun effet bénéfique n'a été observé au niveau de l'inflammation à bas bruit et seul un effet partiel sur le stress oxydant systémique et vasculaire a été mis en évidence. Par ailleurs, il n'est pas possible d'exclure que des constituants des protéines de colza, autres que ces deux aminés puissent participer à la

réduction des effets délétères induits par le repas hyperlipidique. Le choix de l'arginine et de la cystéine sur les 20 acides aminés protéinogènes, limite quelque peu une analyse plus globale de l'influence des acides aminés des protéines de colza sur la fonction endothéliale vasculaire. En outre, les méthodes d'extraction et de séparation de la fraction protéique des protéines végétales en général, et des protéines de colza en particulier, n'excluent pas la présence de microconstituants intimement associés à la fraction protéique, tels des polyphénols ou les saponines, qui pourraient exercer un effet protecteur sur la fonction endothéliale vasculaire et le risque vasculaire.
Une caractérisation plus fine de l'effet protecteur des protéines de colza dans différentes conditions aiguë et chronique, en utilisant d'autres marqueurs de la dysfonction endothéliale, sera nécessaire pour mieux appréhender l'impact des différents constituants des protéines de colza sur la fonction endothéliale vasculaire et les mécanismes sous-jacents.

Ces résultats de modulation de la fonction endothéliale vasculaire par la nature des protéines d'un repas hyperlipidique recèlent un intérêt non seulement en termes de compréhension de phénomènes physiopathologiques précoces de l'athérosclérose mais aussi en termes de nutrition préventive. Ainsi, il convient d'envisager les protéines alimentaires et leur contenu en acides aminés comme de véritables stratégies nutritionnelles de prévention et de traitement de désordres métaboliques associés à un risque cardiovasculaire et diabétique élevé.

ANNEXE

Article 5: Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats

British Journal of Nutrition. 2008 Nov;100(5):984-91.

François Mariotti, Dominique Hermier, Charlotte Sarrat, Joëlle Magné, Evelyne Fénart, Jacques Evrard, Daniel Tomé, Jean François Huneau

Introduction et objectifs

Le syndrome métabolique est défini comme une combinaison de désordres métaboliques prédisposant à un risque cardiovasculaire et diabétique élevé. La présence de trois critères cliniques sur les cinq suivants permet de caractériser un syndrome métabolique : élévation de la triglycéridémie, cholestérol HDL bas, obésité abdominale, glycémie à jeun élevée, élévation de la pression artérielle (NCEP-report 2002). D'un point de vue physiopathologique, l'insulino-résistance joue un rôle fondamental dans l'initiation et le développement du syndrome métabolique (Meigs et al. 1997; Meigs 2000; Hanley et al. 2004; Kahn et al. 2005). Ainsi, la probabilité de survenue d'un accident vasculaire coronarien est multipliée par quatre en présence d'un syndrome métabolique et la prévalence, de 10% en France et de 25% aux États-Unis, est en constante augmentation (Balkau et al. 2003; Ford et al. 2004). Cependant, les stratégies nutritionnelles de prévention et de traitement de ce syndrome sont largement discutées. Plusieurs approches nutritionnelles, telle une modulation de la qualité des glucides ou de la qualité en acides gras, ont été documentées en termes de prévention de l'insulino-sensibilité (Daly 2003; Carpentier *et al.* 2006; Feldeisen et Tucker 2007), mais très peu d'études ont examiné l'impact de la qualité des protéines.

Chez des rats soumis à des régimes de type occidentaux, riche en saccharose et en acides gras saturés, il a été démontré que certaines fractions protéiques du régime prévenaient l'insulino-résistance et ces effets bénéfiques ont largement été attribué au contenu en acides aminés de ces protéines (Lavigne *et al.* 2000; Lavigne *et al.* 2001; Blouet *et al.* 2007a). En effet, une récente étude a rapporté que des protéines riches en cystéine, précurseur naturel du glutathion, réduisait les désordres métaboliques associés à l'insulino-résistance (Blouet et al. 2006). Dans ce contexte, les protéines de colza, naturellement riche en cystéine, apparaissent comme un

bon candidat afin d'examiner le potentiel des protéines à moduler les dérégulations métaboliques associés au syndrome métabolique. Aussi, avons-nous cherché à savoir si la substitution des protéines de lait d'un régime de type occidental par des protéines de colza pouvait prévenir l'initiation de l'insulino-résistance induite.

Matériels et méthodes

Trois groupes de 10 rats wistar ont reçu, pendant 9 semaines, trois régimes expérimentaux :

- régime I (Inducteur), riche en acides gras saturés (de l'huile de palme) et en saccharose
- régime R (Colza), similaire au régime I mai les protéines de lait sont remplacées par des protéines de colza
- régime P (Prudent), contenant des protéines de lait, et de l'amidon et des acides gras polyinsaturés n-3 à la place du saccharose et des acides gras saturés

Des prélèvements sanguins ont été réalisé, à 0, 3, 5 et 9 semaines, afin de mesurer les concentrations en triglycérides, cholestérol total, HDL-cholestérol plasmatiques, ainsi que la glycémie et l'insulinémie à jeun. Des mesures de la pression artérielle ont été effectuées à 3, 5 et 9 semaines par pléthysmographie. A 7 semaines, nous avons réalisé un test de tolérance au glucose.

Enfin, le sacrifice des animaux a été réalisé, à 9 semaines, afin d'évaluer la composition corporelle. Des prélèvements sanguins ont été réalisés en vue du dosage du glutathion sanguin total et réduit.

Discussion et conclusion

Cette étude montre que substituer des protéines de lait par des protéines de colza inhibe l'initiation de l'insulino-résistance induite par un régime riche acides gras saturés et riche en saccharose chez le rat. De façon intéressante, cet effet protecteur des protéines de colza se traduit non seulement par une réduction de l'insulinémie à jeun mais aussi par une amélioration de l'insulino-sensibilité, observé lors du test de tolérance orale au glucose. Bien que nous n'ayons pas montré de modulation du potentiel redox du glutathion sanguin, l'augmentation du glutathion sanguin total observé uniquement après le régime colza, suggère une participation de la cystéine, précurseur naturel du glutathion, aux effets bénéfiques des protéines de colza. Des effets protecteurs similaires ont été observés lors de l'utilisation de protéines du lactosérum riche en cystéine, et de protéines de soja (Lavigne *et al.* 2000;

Lavigne *et al.* 2001; Blouet *et al.* 2006; Blouet *et al.* 2007a), soulevant ainsi l'importance de la modulation de la qualité des protéines en termes de prévention du risque cardiovasculaire et diabétique.

En comparant nos résultats avec ceux d'autres études induisant des désordres métaboliques associés à l'insulino-résistance chez le rat, il est intéressant de noter que, au terme de notre étude, après 9 semaines de régime riche en acides gras saturés et riche en saccharose, nous n'avons pas observé d'excès de masse grasse caractérisant une obésité viscérale. Ainsi, notre modèle d'étude est caractérisé par une insulino-sensibilité et une hypertriglycéridémie, spécifiant ainsi les effets bénéfiques des protéines colza dans la phase d'initiation de l'insulino-résistance. D'autres études restent à réaliser avant d'envisager l'utilisation des protéines de colza comme stratégie nutritionnelle de prévention et de traitement du syndrome métabolique. Cette étude est la première à montrer que le poids de la nature des protéines du régime peut être comparable à celui de la nature des lipides et des glucides en termes de modulation de l'initiation de la résistance à l'insuline.

British Journal of Nutrition (2008), **100**, 984–991 doi:10.1017/S000711450896092X
© The Authors 2008

Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats

François Mariotti[1,2]*, Dominique Hermier[1,2], Charlotte Sarrat[1,2], Joëlle Magné[1,2], Evelyne Fénart[3], Jacques Evrard[4], Daniel Tomé[1,2] and Jean François Huneau[1,2]

[1]*AgroParisTech, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France*
[2]*INRA, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France*
[3]*National Agency for Oilseeds Development, 75008 Paris, France*
[4]*Technical Centre for Oilseed Crops, 33600 Pessac, France*

(Received 15 November 2007 – Revised 14 January 2008 – Accepted 13 February 2008 – First published online 8 April 2008)

In contrast to the quality of carbohydrates and lipids, little is known on the influence of the type of dietary protein on the development of the metabolic or insulin resistance syndrome. Cysteine intake has been recently documented to impact insulin sensitivity. The aim of this study was to determine whether rapeseed protein, an emergent cysteine-rich protein, could inhibit the onset of the metabolic syndrome. For 9 weeks, rats were fed a diet rich in saturated fats and sucrose, which also included 20 % protein either as milk protein ('Induction' diet I) or rapeseed protein (diet R). A third, control group received an isoenergetic diet containing milk protein but polyunsaturated fats and starch ('Prudent' diet P). Plasma glucose, insulin, TAG and cholesterol, and blood pressure were monitored during the study, glucose tolerance was tested at week 7 and body composition determined at week 9. Plasma glucose, insulin and TAG increased during the experiment and, at week 9, plasma insulin was significantly 34 % lower in the R group and 56 % lower in P group as compared with the I group. The insulin peak after the glucose load was significantly 28–30 % lower in R and P than in I and the insulin sensitivity index was significantly higher in R than in I. Unexpectedly, peripheral fat deposition was slightly higher in R than in I. In this model, substituting rapeseed protein for milk protein had preventive effects on the early onset of insulin resistance, similar to those achieved by manipulating the types of dietary fat and carbohydrates.

Insulin resistance: Dietary protein: Metabolic syndrome: Body composition: Cysteine: Glutathione

The metabolic syndrome is a corpus of cardiovascular risk factors that cluster together. The clinical criteria used to define metabolic syndrome vary, but it is usually defined – according to National Cholesterol Education Program - Third Adult Treatment Panel – as comprising three or more of the following abnormalities: hypertriacylglycerolaemia, low HDL, high fasting glucose, excessive waist circumference and elevated blood pressure, on the basis of associations with adverse cardiovascular outcomes derived from large research trials[1]. In addition, adults with the metabolic syndrome are at a greater risk of developing diabetes mellitus. The prevalence of the metabolic syndrome is rapidly increasing in Western countries, being about 10 % in France and higher than 25 % in the general population in the USA[2,3]. Beyond its clinical definitions, and from a pathophysiological point of view, the metabolic syndrome is mainly considered as the expression of a complex, multi-tissue insulin resistance syndrome, so has therefore been termed 'insulin resistance syndrome' by many investigators[4–6]. Indeed, notwithstanding the complexity of the pathophysiological interrelations, insulin resistance is central to the onset of the metabolic syndrome, or at least that of most of the clusters grouped under the definition of the metabolic syndrome[1,7–10]. From an experimental point of view, studies in rodents fed Western-type diets rich in saturated fats and refined carbohydrates have shown that diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome[11].

Strategies targeting the nutritional prevention and treatment of the metabolic syndrome are still under debate. Body-weight control, manipulation of the quantities and quality of carbohydrates and lipids and higher dietary fibre contents are the main strategies considered for metabolic syndrome patients.

A large body of evidence shows that the type of energy macronutrients in the diet, namely, lipids (PUFA, in particular *n*-3, *v.* SFA) and carbohydrates (low *v.* high glycaemic index) has a major impact on insulin sensitivity[12–16]. By contrast, the quality of dietary protein has been overlooked. However, we[17] and others[18] have shown that some types of dietary protein can specifically prevent insulin resistance in rats fed a high-sucrose diet, without any modifications to body weight or composition. The mechanisms are traditionally ascribed to the amino acid pattern of dietary sources[19]. Recently, we demonstrated that a large proportion of the

Abbreviation: HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance.

* **Corresponding author:** Dr François Mariotti, fax +33 1 44081858, email francois.mariotti@agroparistech.fr

British Journal of Nutrition

acute and chronic beneficial effects of some cysteine-rich proteins on insulin sensitivity could originate in the potential of cysteine to alleviate the detrimental effects of diet on glutathione redox status[20,17].

Rapeseed protein is a main fraction of rapeseed meal, a co-product of the extraction of oil for both edible use and the growing sector of bio-diesel fuel. Interestingly, rapeseed protein has recently been demonstrated to be of high nutritional value in human subjects[21]. Rapeseed protein, being rich in cysteine and a good source of other candidate amino acids such as the nitric oxide precursor arginine[22,23], is an attractive candidate for further study of the potential of dietary protein to prevent insulin resistance and related metabolic/physiological abnormalities in the setting of the metabolic syndrome.

The aim of the present study was therefore to examine whether rapeseed protein, if substituted for standard milk protein in a Western-type diet rich in saturated lipids and sucrose, could affect the onset of insulin resistance and related abnormalities. To compare this potential with the current paradigm concerning the benefits of manipulating the quality of carbohydrates and lipids, we aimed to compare its effects with those of a diet containing the same level of energy-yielding macronutrients but where sucrose and SFA were replaced by starch and *n*-3 PUFA.

Experimental methods

Animals and diets

The '*Principles of Laboratory Animal Care*' (NIH publication no. 85-23, revised 1985) and French guidelines concerning the care and use of laboratory animals were followed. Thirty Wistar–Hanover male rats (Harlan, France), weighing 130–140 g on arrival, were housed individually, with free access to food and tap water, under a 12 h light–dark cycle with the lights going on at 05.00 hours. The experimental diets were prepared under strict laboratory conditions by UPAE (Experimental Food Preparation Unit, INRA, Jouy-en-Josas, France). A rapeseed protein isolate was prepared as previously described[21]. During the first 6 d, animals were fed a habituation diet ('Baseline diet', Table 1), which was a modified AIN-93 diet with a higher protein content (29 % total energy) and a higher lipid content and isoenergetic when compared with the experimental diets. The animals were then divided into three groups (Induction (diet I); Rapeseed (diet R); Prudent (diet P)) with similar body weight (136 (SD 7), 136 (SD 5) and 138 (SD 5) g for groups I, R and P, respectively) and each group was assigned to one experimental diet (Table 1) for 9 weeks. The control experimental diet (diet I) was mainly composed of sucrose as the carbohydrate source and saturated fat (palm oil) as the lipid source. Diet R was similar to diet I but contained rapeseed protein isolate instead of milk protein concentrate as the protein source. By contrast, diet P contained milk protein concentrate as the protein source but starch instead of sucrose and polyunsaturated *n*-3 rich fat (rapeseed oil) instead of saturated fat (palm oil). Because the rapeseed protein isolate contained a higher level of crude protein than the milk protein concentrate, and because the latter also included small quantities of milk fat, we adjusted the amount of rapeseed protein so that the diets would be isonitrogenous and the residual was equilibrated between diets using small quantities of maize starch and milk fat. All diets were isoenergetic, with fat, carbohydrates and protein amounting to 32 %, 50 % and 18 % total energy content, respectively, as calculated on the basis of 37·7 kJ (9 kcal) per g lipid and 16·7 kJ (4 kcal) per g carbohydrates and protein. The weights and food intake of animals were determined weekly.

Table 1. Diet composition*

	Composition (g/100 g)			
		Experimental diets†		
	Baseline diet	I	R	P
Milk protein concentrate – crude protein	19·25	19·25	–	19·25
Milk protein concentrate – non-N residual‡	5·75	5·75	–	5·75
Rapeseed protein isolate – crude protein	–	–	19·25	–
Rapeseed protein isolate – non-N residual‡	–	–	1·45	–
Maize starch	43·6	2·0	5·8	43·6
Sucrose	7·1	48·7	48·7	7·1
Palm oil	–	10·9	10·9	–
Rapeseed oil	–	–	–	10·9
Milk fat	–	–	0·5	–
Lupin oil	–	3·6	3·6	3·6
Oleisol oil	14·5	–	–	–
AIN-93M-MX mineral mix	3·5	3·5	3·5	3·5
AIN-93-VX vitamin mix	1·0	1·0	1·0	1·0
α-Cellulose	5·0	5·0	5·0	5·0
Choline	0·23	0·23	0·23	0·23

I, induction; R, rapeseed; P, prudent.
* For details of diets and procedures, see Experimental methods.
† Experimental diets included the same amount of fat, carbohydrates and protein.
‡ As the crude protein content differed slightly between milk and rapeseed protein source, different amounts were used so that the diets were isonitrogenous (19·25 g protein per 100 g feed) and the non-protein residual was adjusted using small amounts of starch and milk fat.

Experimental design

During the first 2 weeks, rats were adapted to laboratory conditions, handling and blood pressure measurements. Blood was sampled at weeks 0, 3, 5 and 9, in the morning after food had been removed at 19.00 hours. Blood drawn from a tail vein was dropped into pre-chilled tubes containing 35 μl (per 500 μl blood) of a solution of EDTA (0·7 % (w/v)) and aprotinin (0·014 % (w/v)). Plasma was separated (1800 ***g***, 20 min, 4°C) and aliquots were stored at −20°C. At week 9, for whole-blood glutathione determinations, two additional 70 μl blood samples were drawn on ice and immediately deproteinized by the addition of 70 μl TCA (10 % (w/v), 4°C), vortexed, centrifuged (9000 ***g***, 5 min, 4°C). The supernatant, stored at 4°C, was assayed on the same day.

Systolic and diastolic blood pressures were determined on weeks 3, 5 and 9 by volume-pressure recordings using an automated tail-cuff plethysmographic device (XBP 1000; Kent Scientific, Torrington, CT, USA), as previously described[24]. Rats from the three groups were processed in a randomized Latin-square order, on the same day of each week, in the fasted state.

On week 7, all rats underwent an oral glucose test, as previously described[17]. Briefly, an indwelling catheter

British Journal of Nutrition

(Introcan Certo; B Braun Medical, France) was inserted in a distal lateral tail vein, locked with heparinized saline, secured to the tail with medical adhesive tape and coated with anti-onychophagic bitter varnish. Blood was collected via the catheter before and 10, 30, 60 and 120 min after the rats had received a 1 g/kg body weight D-glucose oral load.

At the end of the experiment (week 9), the rats were administered an overdose of pentobarbital (30 mg/kg body weight, intraperitoneally), exsanguinated and dissected out. The liver, two abdominal fat pads (retroperitoneal and epididymal) and the interscapular brown fat pad were isolated and weighed and subcutaneous fat in the lower half of the animal was carefully dissected out (by the same person) and weighed. The stripped carcass was prepared (by discarding other abdominal and thoracic organs and severing the distal parts of the limbs, head and tail) and weighed.

Biochemical analysis and calculations

Food efficiency was calculated as weight gain (g) divided by food intake (g). Blood glucose concentrations were measured using a Glucometer (Roche Diagnostics, Meylan, France). Insulin was detected by a solid phase two-site enzyme immunoassay (Mercodia Rat Insulin ELISA, Paris, France). Plasma total cholesterol, HDL-cholesterol and TAG concentrations were determined using standard enzymic assays (Cholesterol RTU and triglycerides PAP 150; BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Whole-blood oxidized (GSSG) and total GSH concentrations were measured using the enzymic recycling method described by Anderson[25] on six samples per diet group. The reduction potential of the GSSG/2GSH half-cell (GSH Ehc), an indicator of intracellular redox status, was calculated using the following formula[26]:

$$\text{GSH Ehc (mV)} = -264 + \frac{59{\cdot}1}{2}\log(\text{GSSG}/\text{GSH}^2),$$

where GSH and GSSG are expressed in mol/l. The homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was used as an index of insulin resistance[27]. HOMA-IR was calculated as fasting insulin (mU/l) × fasting glucose (mmol/l)/22·5, with 1 mU insulin equal to 6 pmol.

The insulin sensitivity index based on the glucose oral tolerance test[28] was calculated at 60 and 120 min after the load, according to Belfiore *et al.* [29], as:

$$\frac{2}{(\text{AIns}_i/\text{AIns}_p \times \text{AGly}_i/\text{AGly}_p) + 1},$$

where AGly_i and AIns_i are the areas under the plasma glucose and insulin curves above baseline for rat i and AGlyp and AInsp the mean areas under the plasma glucose and insulin curves above baseline for reference diet P.

Statistical analyses

Repeated measurements (i.e. weekly measures or post-glucose challenge measures) were analysed using a mixed model with diet and time (i.e. weeks or min) as independent, fixed factors and the rat as a random factor, nested in the diet factor (SAS institute, Cary, NC, USA). For repeated measurements, when the time–diet interaction was $P<0{\cdot}10$, two pre-planned comparisons between treatment diets (R and P) and the control diet (I) were made at week 9 (for weekly measurements, this being the last time point of the study) or at time 10 min (for post-glucose plasma insulin, this being the peak time) using *ad hoc* contrasts under the mixed models. For selective measurements (at week 9), data were analysed with ANOVA and post-test comparisons between treatment diets (R and P) and the control diet (I) were performed using the Dunnett test. A P value $<0{\cdot}05$ was considered to be significant.

Results

Food consumption, body weight and composition

Food consumption and body weight gain did not differ significantly between the groups throughout the experiment (data not shown). Average food consumption and final body weight are shown in Table 2. However, total food efficiency (Table 2) was significantly higher in group R than in group I. Body composition at week 9 did not differ between groups except for the subcutaneous fat component, which was higher in group R (Table 2).

Metabolic parameters

Plasma glucose increased slightly over time ($P<0{\cdot}001$) but did not vary as a function of diet type (Table 3). Plasma insulin rose markedly over time ($P<0{\cdot}0001$) and was significantly affected by the diet (diet effect, $P<0{\cdot}05$; diet × time interaction, $0{\cdot}05 < P<0{\cdot}10$, Table 3). At week 9, plasma insulin (Table 3) differed between diets ($P<0{\cdot}01$) and was significantly lower in groups R and P than in group I. Accordingly, the HOMA-IR index (Fig. 1) increased over time ($P<0{\cdot}0001$) and was affected by the diet (diet effect, $P<0{\cdot}05$; diet × time interaction, $P<0{\cdot}05$). At week 9, HOMA-IR differed significantly between diets ($P<0{\cdot}01$), being lower in groups R and P than in group I. Systolic and diastolic blood pressures (Table 3) did not vary with time or diet. Plasma TAG concentrations (Table 3) increased significantly with time but were not significantly affected by diet type. Plasma cholesterol decreased, plasma HDL-cholesterol increased (Table 3) and the HDL-:total cholesterol ratio (data not shown) increased slightly over time ($P<0{\cdot}001$), but in a similar manner with all diets (Table 3).

Following the oral glucose challenge, plasma glucose (Fig. 2 (A)) and area under the curve (data not shown) were similar in all groups. By contrast, the increase in plasma insulin (Fig. 2 (B)) was significantly affected by diet type. After the load (10 min) (i.e. at the insulin peak), plasma insulin concentrations were markedly and significantly lower in groups R and P than in group I. The Belfiore index of insulin sensitivity, calculated at both 60 min and 120 min after the glucose load (Fig. 3), was significantly higher in group R than in group I.

Whole-blood glutathione was significantly 30 % higher after diet R than after diet I (Table 4) and GSH in the reduced form tended ($P=0{\cdot}08$) to be higher after diet R (data not shown). However, the half-cell reduction potential of the GSH/GSSG redox couple did not differ between the groups (Table 4).

Discussion

The main finding of the present study is that rapeseed protein substituted for milk protein inhibited the onset of insulin

NS British Journal of Nutrition

Table 2. Body composition, average food intake and total food efficiency in rats fed with the induction diet (rich in saturated fat and sucrose) containing milk protein (diet I), diet I containing rapeseed protein (diet R) or an isoenergetic diet including milk protein but rich in polyunsaturated *n*-3 fat and starch (diet P) for 9 weeks*

(Mean values with their standard errors)

	Diet					
	I		R		P	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
BW (g)	359	8	374	9	354	10
9-week average food intake (g/d)	17·5	0·4	16·9	0·3	16·2	0·4
Food efficiency (‰)	206	7	227†	5	212	5
Brown adipose tissue (g)	0·76	0·03	0·75	0·05	0·76	0·04
Liver (g)	8·6	0·3	8·7	0·2	8·4	0·3
Liver (%BW)	2·4	0·1	2·3	0·04	2·4	0·1
Epididymal fat pad (g)	10·3	0·8	12·2	0·8	10·6	0·6
Epididymal fat pad (%BW)	2·88	0·21	3·28	0·21	2·98	0·13
Retroperitoneal fat pad (g)	10·7	1·1	12·0	0·8	10·3	0·7
Retroperitoneal fat pad (%BW)	2·97	0·25	3·20	0·17	2·91	0·16
Lower subcutaneous fat (g)	13·9	1·0	17·8†	1·3	14·0	1·0
Lower subcutaneous fat (%BW)	3·87	0·25	4·74†	0·30	3·94	0·20
Stripped carcass (g)	161	3	162	4	157	4
Stripped carcass (%BW)	45·1	0·6	43·4	0·7	44·2	0·6

BW, body weight.
* For details of animals and procedures, see Experimental methods.
† Mean values were significantly lower than those of diet I, as tested with Dunnett *post hoc* test; $P<0·05$.

resistance in rats fed the high-saturated, high-sucrose diet. First, rapeseed protein led to a reduction in fasting plasma insulin when compared with milk protein, thereby moderating or slowing down compensatory hyperinsulinaemia (Fig. 1), which was the critical parameter in the present model. Second, the improved insulin sensitivity to glucose homeostasis was further substantiated by the oral glucose tolerance test. During this test, the improved insulin sensitivity index could mostly be explained

Table 3. Metabolic markers before (week 0) and after (weeks 3, 5 and 9) rats were fed with either the induction diet (rich in saturated fat and sucrose) containing milk protein (diet I), diet I containing rapeseed protein (diet R) or an isoenergetic diet including milk protein but rich in polyunsaturated *n*-3 fat and starch (diet P)*

(Mean values with their standard errors)

		Week							
		0		3		5		9	
	Diet	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Blood glucose (g/l)	I	0·99	0·04	1·12	0·08	1·16	0·05	1·12	0·05
	R	0·99	0·07	1·12	0·08	1·16	0·03	0·95	0·02
	P	0·90	0·04	1·00	0·04	1·13	0·04	1·04	0·03
Plasma insulin (pmol/l)	I	41	4	67	10	125	24	224	57
	R	40	3	126	30	126	14	147†	42
	P	35	2	63	11	62	12	99†	14
Diastolic blood pressure (mmHg)	I	ND	ND	92	3	88	5	91	5
	R	ND	ND	95	3	88	4	88	7
	P	ND	ND	84	3	89	3	89	4
Systolic blood pressure (mmHg)	I	ND	ND	126	3	124	5	131	5
	R	ND	ND	129	4	124	5	122	6
	P	ND	ND	118	2	126	4	128	4
Plasma TAG (mmol/l)	I	0·76	0·08	0·94	0·09	0·93	0·10	1·06	0·15
	R	0·74	0·11	0·85	0·06	0·92	0·08	0·90	0·09
	P	0·69	0·07	0·81	0·08	0·87	0·08	0·85	0·13
Plasma total cholesterol (mmol/l)	I	1·65	0·08	1·50	0·08	1·34	0·10	1·42	0·08
	R	1·89	0·08	1·55	0·16	1·40	0·10	1·60	0·10
	P	1·94	0·10	1·65	0·08	1·58	0·08	1·63	0·10
Plasma HDL-cholesterol (mmol/l)	I	0·75	0·08	0·90	0·05	0·72	0·03	0·88	0·08
	R	0·78	0·05	0·96	0·05	0·75	0·08	0·90	0·05
	P	0·72	0·05	1·14	0·05	0·96	0·08	1·03	0·08

ND, not determined.
* For details of animals and procedures, see Experimental methods.
† Mean values were significantly lower than those of diet I, assessed by pre-planned contrast at week 9: $P<0·05$.

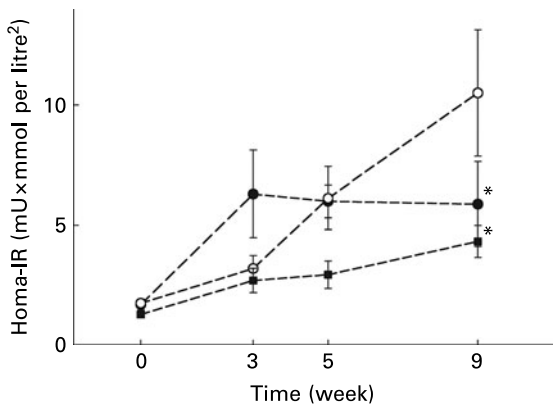


Fig. 1. Mean values and standard errors (*n* 10) for model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) calculated from fasting blood glucose and plasma insulin concentrations in rats fed for 9 weeks with either the induction diet (diet I) (rich in saturated fat and sucrose) containing milk protein (○), diet I containing rapeseed protein (●) or an isoenergetic diet including milk protein but rich polyunsaturated fat and starch (■). The effect of time ($P<0{\cdot}01$), diet ($P<0{\cdot}05$) and the diet × time interaction ($P<0{\cdot}05$) were analysed using repeated-measure ANOVA. Pre-planned comparisons with control diet I were made at week 9; * mean values were significantly different from those of diet I: $P<0{\cdot}05$.

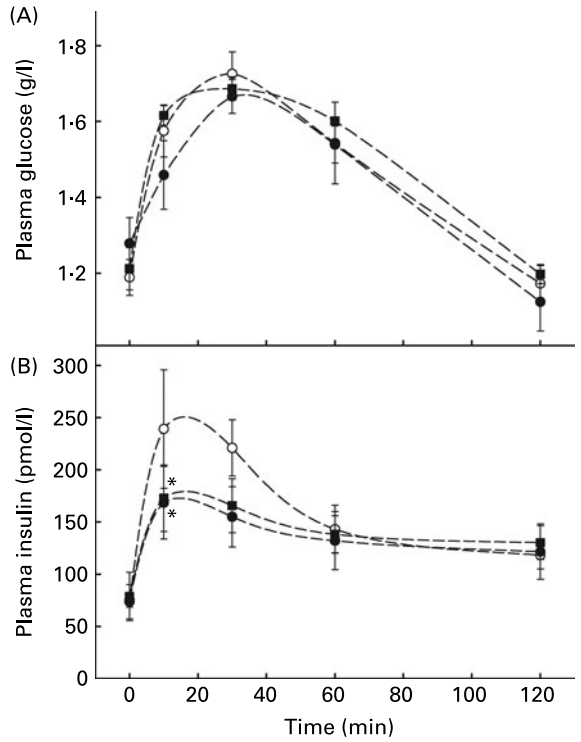


Fig. 2. (A) Mean blood glucose concentrations and standard errors (*n* 10) during the oral glucose tolerance test in rats fed with either the induction diet (rich in saturated fat and sucrose) containing milk protein (○), the induction diet (diet I) containing rapeseed protein (●) or an isoenergetic diet including milk protein but rich polyunsaturated fat and starch (■) for 7 weeks. The effect of time ($P<0{\cdot}001$), diet (NS) and the diet × time interaction (NS) were analysed using repeated-measure ANOVA. (B) Mean plasma insulin concentrations and standard errors (*n* 10) during the oral glucose tolerance test, simultaneously under the same conditions. The effect of time ($P<0{\cdot}001$), diet (NS) and the diet × time interaction ($P<0{\cdot}05$) were analysed using repeated-measure ANOVA. Pre-planned comparisons with control diet I were made at week 9; * mean values were significantly different from those of diet I: $P<0{\cdot}05$.

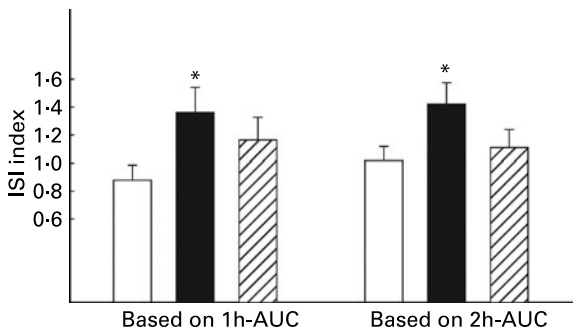


Fig. 3. Mean values for Belfiore's insulin sensitivity index (ISI) and standard errors calculated from glucose and insulin area under the curve (AUC) values 1 h and 2 h after the glucose load in rats fed with either the induction (I) diet (rich in saturated fat and sucrose) containing milk protein (□), the I diet containing rapeseed protein (R; ■) or an isoenergetic diet including milk protein but rich in polyunsaturated fat and starch (P; ▨) for 7 weeks. The effect of diet ($P<0{\cdot}05$) was tested with ANOVA. *Post-hoc* comparisons between treatment diets R and P and the control diet (I) were performed using the Dunnett test. * Mean values were significantly different from those of the diet I: $P<0{\cdot}05$. For details of diets and procedures, see Experimental methods.

by a markedly lower plasma insulin excursion after the glucose load, for a comparable plasma glucose excursion (Fig. 2). A similar feature had been reported regarding the effect of cysteine enrichment in a sucrose-rich diet[17] and that of cod or soya protein substitution for casein in a high-saturated fat, high-sucrose diet[18]. When comparing the effects of protein type (rapeseed *v.* milk) with the effect of the type of fat and carbohydrates, it is of note that they were of a similar magnitude. As well as the importance of the overall contribution of the macronutrient to diet energy, the importance of the types of fats and carbohydrates to prevention and, in most cases, to the treatment of the metabolic syndrome has been widely investigated[14,30,31]. The present result thus highlights the importance of the type of protein as a major component of diet quality, in terms of cardiovascular and diabetic risks.

During the current study, the high-saturated fat/high-sucrose diet induced insulin resistance, characterized by a marked increase in fasting plasma insulin values over weeks. Diet I was also associated with a slight increase in TAG, but not with changes to other metabolic or physiological abnormalities. As far as the plasma cholesterol profile is concerned, the increase in HDL:total cholesterol with time resulted from both an increase in HDL-cholesterol and a decrease in total cholesterol. These variations were unexpected, but were observed to a similar extent in the three dietary groups. Although data on the natural variation in plasma cholesterol profile are lacking in the rat, the present changes in total and HDL-cholesterol may have originated from ageing rather than the nutritional conditions. As far as body composition is concerned, it is not possible to draw any definite conclusions from the present study as to the level of obesity (especially of the visceral type) because the experiment did not include a group receiving a standard chow. However, if the findings were compared with those of other studies in our laboratory (e.g. Blouet *et al.* [32]), rats did not exhibit higher total body fat and/or regional fat excess and it is therefore likely that diet I did not (or at least during the time allotted) result in obesity or visceral obesity. Further, it is not surprising that blood pressure values did not rise during the study, in the light of

British Journal of Nutrition

Table 4. Whole-blood glutathione status in rats fed with either the induction diet (rich in saturated fat and sucrose) containing milk protein (diet I), the induction diet containing rapeseed protein (diet R) or an isoenergetic diet including milk protein but rich in polyunsaturated *n*-3 fat and starch (diet P) for 9 weeks*

(Mean values with their standard errors)

		Diet					
		I		R		P	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Whole-blood glutathione	Total (μmol/l)	631	118	821†	56	581	61
	Oxidized (μmol/l)	69	14	102	14	87	15
	Ehc (mV)	−199	3	−200	2	−193	3

Ehc, half-cell reduction potential of the oxidised glutathione/2 total glutathione couple (see Biochemical analysis and calculations).
* For details of animals and procedures, see Experimental methods.
† Mean values were significantly lower than those of diet I, as tested with Dunnett *post-hoc* test; $P<0.05$.

reports that this parameter lags far behind other abnormalities in diet-induced metabolic syndrome[33]. Finally, our model was found to reflect the initiation of insulin resistance, as illustrated by marked and progressive compensatory hyperinsulinaemia. This model is associated with glucose intolerance and a moderate elevation of triacylglycerolaemia. However, there is little doubt that our dietary model of induction would eventually lead to a typical metabolic syndrome. First, as in the present model, hyperinsulinaemia and glucose intolerance are the first manifestations of diet-induced metabolic syndrome, the former being the first feature of insulin resistance on glucose homeostasis[34]. Furthermore, and as discussed earlier, insulin resistance is central to the clustering of abnormalities in human subjects[10,35,36]. Second, similar diets have been reported as leading eventually to the complete clustering of metabolic abnormalities. The sequences and timing of other abnormalities vary considerably and it is difficult to draw a clear picture from the literature because different studies used different diets, which differ in: (1) the proportion of fat *v.* refined sugar; (2) the type of refined sugar (fructose *v.* sucrose), saturated fat (lard fat or palm oil, as in the present study) or other components[37–39] and also resorted to different rat strains, gender and study duration. In this regard, although the duration of the present study was based on our literature survey, that a longer period of study would have been needed to show all traits of the metabolic syndrome in the present model before the end of the study further illustrates the profound heterogeneity in the conditions and effects reported in the literature. However, the full sequence of abnormalities has been repeatedly and clearly demonstrated in Fisher rats receiving a diet with a composition similar to that used during our study[40,41]. Indeed, use of a high (saturated) fat and refined sugar diet (which is, interestingly, an equilibrated means of combining the deleterious effects of each macronutrient[42]), is probably the most relevant as a model for Westernized diets. Finally, insulin sensitivity is recognized as a very important target function, and glucose tolerance an excellent endpoint, when examining the potential for diet to modulate cardiovascular and diabetic risk[43].

Based on the favourable effects of rapeseed protein on glutathione status, the links between cysteine, glutathione and insulin sensitivity may be involved in the favourable effect of rapeseed protein. In sucrose-fed rats, we previously reported strong, reproducible and dose-dependent associations between glutathione redox status in numerous tissues and insulin sensitivity that were likely to explain the favourable effect of dietary cysteine[17]. In addition, other authors have largely documented that liver glutathione is a critical component in the 'hepatic insulin sensitizing substance', a substance that largely drives peripheral insulin sensitivity[44,45]. Our observation of a higher glutathione content in the whole blood of rapeseed-fed rats, although the redox state was similar, fuels observations that the intake of cysteine in nutritional amounts can impact glutathione status[17,46,47] and also suggests that the effect of rapeseed may be driven by its cysteine content. Other characteristics of the rapeseed protein may have played a role and a synergetic effect of arginine might also be involved[48]. Further dedicated studies are needed to closely address the precise underlying mechanism.

Similarly, the increased food efficiency and higher subcutaneous fat deposition reported in the present study may unravel other complex metabolic features associated with manipulation of the protein source in this induction diet. Some data have shown that, unlike visceral fat, subcutaneous fat may be neutral or even reduce the risk of insulin resistance and related metabolic dysregulation[49–52]. A preferential development of peripheral fat with a similar percentage of body weight as visceral fat may therefore be linked to the reduced development of insulin resistance evidenced in the current study. It would be interesting to determine how rapeseed protein elicits this effect and how it could be related to favourable effects on insulin resistance.

Further studies are required to closely address the underlying mechanisms and to assess the benefits of rapeseed protein regarding later endpoints of the metabolic syndrome. Finally, because in complement to the essential 'preventive' role, diet modification is known to exert some reversal effects in diet-induced insulin resistance[53]. Further studies may interestingly, and complementarily, assess if rapeseed protein can improve insulin sensitivity in animals or human subjects that already display insulin resistance.

In conclusion, in this Western-diet model, substituting rapeseed protein for milk protein slowed down the increase in fasting insulinaemia and lowered insulin secretion after a glucose load, thus demonstrating a preventive effect on the onset of insulin resistance. This effect is important inasmuch as it is of a magnitude similar to that afforded by the dual substitution of *n*-3 polyunsaturated fat for saturated fat and

starch for sucrose. The quality of dietary protein may be an underestimated parameter in dietary strategies against the metabolic syndrome.

Acknowledgements

We thank Cécile Faure for her practical assistance during the study and Angélique Foucault-Simonin for animal care and help with dissection. This study was supported in part by a grant from ONIDOL (National Agency for Oilseeds Development, Paris, France) and CETIOM (Technical Centre for Oilseed Crops, Pessac, France). E. F. and J. E. are employed by ONIDOL and CETIOM, respectively.

References

1. Anonymous (2002) Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143–3421.
2. Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, Tichet J & Eschwege E (2003) The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab* **29**, 526–532.
3. Ford ES, Giles WH & Mokdad AH (2004) Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* **27**, 2444–2449.
4. Reaven GM (1991) Resistance to insulin-stimulated glucose uptake and hyperinsulinemia: role in non-insulin-dependent diabetes, high blood pressure, dyslipidemia and coronary heart disease. *Diabetes Metab* **17**, 78–86.
5. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P & Garg R (2005) Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* **111**, 1448–1454.
6. Reaven GM (2005) The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem* **51**, 931–938.
7. Meigs JB, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM & Singer DE (1997) Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* **46**, 1594–1600.
8. Meigs JB (2000) Invited Commentary: insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors. *Am J Epidemiol* **152**, 908–911; discussion 912.
9. Hanley AJ, Festa A, D'Agostino RB Jr, Wagenknecht LE, Savage PJ, Tracy RP, Saad MF & Haffner SM (2004) Metabolic and inflammation variable clusters and prediction of type 2 diabetes: factor analysis using directly measured insulin sensitivity. *Diabetes* **53**, 1773–1781.
10. Kahn R, Buse J, Ferrannini E & Stern M (2005) The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2289–2304.
11. Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM & Berger JJ (1998) Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol* **84**, 1311–1315.
12. Colagiuri S & Brand Miller JC (1997) The metabolic syndrome: from inherited survival trait to a health care problem. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **105**, Suppl. 2, 54–60.
13. Daly M (2003) Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state. *Am J Clin Nutr* **78**, 865S–872S.
14. Reaven GM (2005) The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr* **25**, 391–406.
15. Carpentier YA, Portois L & Malaisse WJ (2006) *n*-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* **83**, 1499S–1504S.
16. Feldeisen SE & Tucker KL (2007) Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* **32**, 46–60.
17. Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathé V, Mikogami T, Tome D & Huneau JF (2007) Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. *Free Radic Biol Med* **42**, 1089–1097.
18. Lavigne C, Marette A & Jacques H (2000) Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E491–E500.
19. Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H & Marette A (2001) Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E62–E71.
20. Blouet C, Mariotti F, Mikogami T, Tome D & Huneau JF (2006) Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. *J Nutr Biochem* **18**, 519–524.
21. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Berot S, Evrard J, Fenart E, Tome D & Gaudichon C (2007) The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *J Nutr* **137**, 594–600.
22. Scherrer U & Sartori C (2000) Defective nitric oxide synthesis: a link between metabolic insulin resistance, sympathetic overactivity and cardiovascular morbidity. *Eur J Endocrinol* **142**, 315–323.
23. Chan NN & Chan JC (2002) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* **45**, 1609–1616.
24. Mariotti F, Hammiche A, Blouet C, Dare S, Tome D & Huneau JF (2006) Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline. *Eur J Nutr* **45**, 383–390.
25. Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**, 548–555.
26. Schafer FQ & Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**, 1191–1212.
27. Wallace TM, Levy JC & Matthews DR (2004) Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* **27**, 1487–1495.
28. Monzillo LU & Hamdy O (2003) Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev* **61**, 397–412.
29. Belfiore F & Iannello S (1998) Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods. *Mol Genet Metab* **65**, 121–128.
30. Oliart Ros RM, Torres-Marquez ME, Badillo A & Angulo Guerrero O (2001) Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats. *J Nutr Biochem* **12**, 207–212.
31. Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA & Ros RM (2004) Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* **15**, 350–357.
32. Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Bos C, Mathe V, Tome D & Huneau JF (2006) The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J Nutr* **136**, 1849–1854.
33. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A & Vaziri ND (2005) A high-fat, refined-carbohydrate diet induces

endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* **98**, 203–210.
34. Reaven GM (2005) Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. *Cell Metab* **1**, 9–14.
35. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA & Stern MP (1992) Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* **41**, 715–722.
36. Petersen KF, Dufour S, Savage DB, *et al.* (2007) The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12587–12594.
37. Ghafoorunissa, Ibrahim A, Rajkumar L & Acharya V (2005) Dietary (*n*-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevent sucrose-induced insulin resistance in rats. *J Nutr* **135**, 2634–2638.
38. Milagro FI, Campion J & Martinez JA (2006) Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* **14**, 1118–1123.
39. Sumiyoshi M, Sakanaka M & Kimura Y (2006) Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr* **136**, 582–587.
40. Barnard RJ, Faria DJ, Menges JE & Martin DA (1993) Effects of a high-fat, sucrose diet on serum insulin and related atherosclerotic risk factors in rats. *Atherosclerosis* **100**, 229–236.
41. Berger JJ & Barnard RJ (1999) Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J Appl Physiol* **87**, 227–232.
42. Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, Cho IH, Pyo JH, Kim CK, Sinclair AJ, Febbraio MA & Watt MJ (2006) Saturated, but not *n*-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* **100**, 1467–1474.
43. Riccardi G, Aggett P, Brighenti F, *et al.* (2004) PASSCLAIM – body weight regulation, insulin sensitivity and diabetes risk. *Eur J Nutr* **43**, Suppl. 2, II7–II46.
44. Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF & Macedo MP (2003) Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G588–G594.
45. Guarino MP & Macedo MP (2006) Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol* **147**, 959–965.
46. Lands LC, Grey VL & Smountas AA (1999) Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. *J Appl Physiol* **87**, 1381–1385.
47. Mariotti F, Simbelie KL, Makarios-Lahham L, Huneau JF, Laplaize B, Tome D & Even PC (2004) Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. *J Nutr* **134**, 128–131.
48. Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ & Wu G (2006) Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem* **17**, 571–578.
49. Frayn KN (2001) Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* **60**, 375–380.
50. Van Pelt RE, Evans EM, Schechtman KB, Ehsani AA & Kohrt WM (2002) Contributions of total and regional fat mass to risk for cardiovascular disease in older women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E1023–E1028.
51. Buemann B, Sorensen TI, Pedersen O, *et al.* (2005) Lower-body fat mass as an independent marker of insulin sensitivity—the role of adiponectin. *Int J Obes (Lond)* **29**, 624–631.
52. Sakai Y, Ito H, Egami Y, Ohoto N, Hijii C, Yanagawa M, Satoh S & Jingu S (2005) Favourable association of leg fat with cardiovascular risk factors. *J Intern Med* **257**, 194–200.
53. Roberts CK, Vaziri ND, Liang KH & Barnard RJ (2001) Reversibility of chronic experimental syndrome X by diet modification. *Hypertension* **37**, 1323–1328.

NS British Journal of Nutrition

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Adams MR, Forsyth CJ, Jessup W, Robinson J et Celermajer DS (1995). "Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young men." J Am Coll Cardiol **26**(4): 1054-61.

Adams MR, Jessup W et Celermajer DS (1997a). "Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: reversibility with oral L-arginine but not vitamin C." J Am Coll Cardiol **29**(3): 491-7.

Adams MR, Jessup W, Hailstones D et Celermajer DS (1997b). "L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules." Circulation **95**(3): 662-8.

Akbari CM, Saouaf R, Barnhill DF, Newman PA, LoGerfo FW et Veves A (1998). "Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in both microcirculation and macrocirculation during acute hyperglycemia." J Vasc Surg **28**(4): 687-94.

Akira S, Takeda K et Kaisho T (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.

Akira S et Takeda K (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.

Alderton WK, Cooper CE et Knowles RG (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.

Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP et Cabezas MC (2007). "Postprandial inflammation and endothelial dysfuction." Biochem Soc Trans **35**(Pt 3): 466-9.

Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP et Castro Cabezas M (2008a). "Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis." Atheroscler Suppl **9**(2): 39-44.

Alipour A, van Oostrom AJ, Izraeljan A, Verseyden C, Collins JM, Frayn KN, Plokker TW, Elte JW et Castro Cabezas M (2008b). "Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(4): 792-7.

Allen JD, Miller EM, Schwark E, Robbins JL, Duscha BD et Annex BH (2009). "Plasma nitrite response and arterial reactivity differentiate vascular health and performance." Nitric Oxide **20**(4): 231-7.

Alp NJ et Channon KM (2004). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(3): 413-20.

Alvarez JA, Higgins PB, Oster RA, Fernandez JR, Darnell BE et Gower BA (2009). "Fasting and postprandial markers of inflammation in lean and overweight children." Am J Clin Nutr **89**(4): 1138-44.

Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A et Frenneaux MP (2001). "The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes." Atherosclerosis **154**(2): 475-83.

Anderson RA, Evans LM, Ellis GR, Khan N, Morris K, Jackson SK, Rees A, Lewis MJ et Frenneaux MP (2006). "Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in Type 2 diabetes." Diabet Med **23**(3): 258-64.

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrange D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC et et al. (1995). "Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations." J Am Coll Cardiol **26**(5): 1235-41.

Andreotti F, Burzotta F, Manzoli A et Robinson K (2000). "Homocysteine and risk of cardiovascular disease." J Thromb Thrombolysis **9**(1): 13-21.

Angus JA et Wright CE (2000). "Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels." J Pharmacol Toxicol Methods **44**(2): 395-407.

Anthony MS, Clarkson TB et Williams JK (1998). "Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms." Am J Clin Nutr **68**(6 Suppl): 1390S-1393S.

Anthony MS (2000). "Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond." J Nutr **130**(3): 662S-3S.

Antoniades C, Tousoulis D, Marinou K, Vasiliadou C, Tentolouris C, Bouras G, Pitsavos C et Stefanadis C (2006). "Asymmetrical dimethylarginine regulates endothelial function in methionine-induced but not in chronic homocystinemia in humans: effect of oxidative stress and proinflammatory cytokines." Am J Clin Nutr **84**(4): 781-8.

Antoniades C, Shirodaria C, Crabtree M, Rinze R, Alp N, Cunnington C, Diesch J, Tousoulis D, Stefanadis C, Leeson P, Ratnatunga C, Pillai R et Channon KM (2007). "Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation." Circulation **116**(24): 2851-9.

Archer DR, Stiles JK, Newman GW, Quarshie A, Hsu LL, Sayavongsa P, Perry J, Jackson EM et Hibbert JM (2008). "C-reactive protein and interleukin-6 are decreased in transgenic sickle cell mice fed a high protein diet." J Nutr **138**(6): 1148-52.

Armah CK, Jackson KG, Doman I, James L, Cheghani F et Minihane AM (2008). "Fish oil fatty acids improve postprandial vascular reactivity in healthy men." Clin Sci (Lond) **114**(11): 679-86.

Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Harrison DG et Quyyumi AA (2006). "The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults." J Am Coll Cardiol **47**(5): 1005-11.

Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Alexander RW, Harrison DG et Quyyumi AA (2008). "Endothelial function and aminothiol biomarkers of oxidative stress in healthy adults." Hypertension **52**(1): 80-5.

Avogaro A, Toffolo G, Kiwanuka E, de Kreutzenberg SV, Tessari P et Cobelli C (2003). "L-arginine-nitric oxide kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: a stable-labelled 15N arginine approach." Diabetes **52**(3): 795-802.

Bae JH, Bassenge E, Kim KB, Kim YN, Kim KS, Lee HJ, Moon KC, Lee MS, Park KY et Schwemmer M (2001). "Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress." Atherosclerosis **155**(2): 517-23.

Bae JH, Schwemmer M, Lee IK, Lee HJ, Park KR, Kim KY et Bassenge E (2003). "Postprandial hypertriglyceridemia-induced endothelial dysfunction in healthy subjects is independent of lipid oxidation." Int J Cardiol **87**(2-3): 259-67.

Bagg W, Whalley GA, Sathu A, Gamble G, Sharpe N et Braatvedt GD (2000). "The effect of acute hyperglycaemia on brachial artery flow mediated dilatation in normal volunteers." Aust N Z J Med **30**(3): 344-50.

Bai Y, Sun L, Yang T, Sun K, Chen J et Hui R (2009). "Increase in fasting vascular endothelial function after short-term oral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a meta-analysis of randomized controlled trials." Am J Clin Nutr **89**(1): 77-84.

Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D, Vol S, Tichet J et Eschwege E (2003). "The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study." Diabetes Metab **29**(5): 526-32.

Barton GM (2008). "A calculated response: control of inflammation by the innate immune system." J Clin Invest **118**(2): 413-20.

Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB et Creager MA (2001). "Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans." Circulation **103**(12): 1618-23.

Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA et Creager MA (2002). "Inhibition of protein kinase Cbeta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans." Circ Res **90**(1): 107-11.

Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, Brownlee M, Bones C, Newcombe RG et Lewis MJ (1998). "Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults." Circulation **98**(18): 1848-52.

Berry SE, Tucker S, Banerji R, Jiang B, Chowienczyk PJ, Charles SM et Sanders TA (2008). "Impaired postprandial endothelial function depends on the type of fat consumed by healthy men." J Nutr **138**(10): 1910-4.

Bickerton AS, Roberts R, Fielding BA, Hodson L, Blaak EE, Wagenmakers AJ, Gilbert M, Karpe F et Frayn KN (2007). "Preferential uptake of dietary Fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period." Diabetes **56**(1): 168-76.

Blackburn P, Despres JP, Lamarche B, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I et Couillard C (2006). "Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men." Obesity (Silver Spring) **14**(10): 1747-54.

Blake GJ et Ridker PM (2002). "Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction." J Intern Med **252**(4): 283-94.

Blendea MC, Bard M, Sowers JR et Winer N (2005). "High-fat meal impairs vascular compliance in a subgroup of young healthy subjects." Metabolism **54**(10): 1337-44.

Blouet C, Mariotti F, Mikogami T, Tome D et Huneau JF (2006). "Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal." J Nutr Biochem **18**(8): 519-24.

Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathe V, Mikogami T, Tome D et Huneau JF (2007a). "Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance." Free Radic Biol Med **42**(7): 1089-97.

Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D et Huneau JF (2007b). "Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats." Exp Biol Med (Maywood) **232**(11): 1458-64.

Blum A, Hathaway L, Mincemoyer R, Schenke WH, Kirby M, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA et Cannon RO, 3rd (2000). "Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmenopausal women." J Am Coll Cardiol **35**(2): 271-6.

Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D et Frolich JC (1998). "L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship." Br J Clin Pharmacol **46**(5): 489-97.

Bode-Boger SM, Scalera F et Ignarro LJ (2007). "The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio." Pharmacol Ther **114**(3): 295-306.

Boger RH, Bode-Boger SM, Mugge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A et Frolich JC (1995). "Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production." Atherosclerosis **117**(2): 273-84.

Boger RH, Bode-Boger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Bohme M, Nafe R, Mugge A et Frolich JC (1997). "Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin." Circulation **96**(4): 1282-90.

Boger RH, Bode-Boger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R et Frolich JC (1998a). "Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits." Atherosclerosis **136**(1): 67-77.

Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF et Cooke JP (1998b). "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia." Circulation **98**(18): 1842-7.

Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD et Lentz SR (2000). "Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(6): 1557-64.

Boger RH et Bode-Boger SM (2001). "The clinical pharmacology of L-arginine." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 79-99.

Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR et Haynes WG (2001). "Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans." Clin Sci (Lond) **100**(2): 161-7.

Boger RH (2003). "The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor." Cardiovasc Res **59**(4): 824-33.

Boger RH, Tsikas D, Bode-Boger SM, Phivthong-Ngam L, Schwedhelm E et Frolich JC (2004). "Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of L-[guanidino-(15)N(2)]-arginine to (15)N-labeled nitrate by gas chromatography--mass spectrometry." Nitric Oxide **11**(1): 1-8.

Boger RH (2006). "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond." Ann Med **38**(2): 126-36.

Boger RH, Sullivan LM, Schwedhelm E, Wang TJ, Maas R, Benjamin EJ, Schulze F, Xanthakis V, Benndorf RA et Vasan RS (2009). "Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community." Circulation **119**(12): 1592-600.

Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E et Rasmussen K (2006). "Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction." N Engl J Med **354**(15): 1578-88.

Bonetti PO, Lerman LO et Lerman A (2003). "Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 168-75.

Bonora E et Muggeo M (2001). "Postprandial blood glucose as a risk factor for cardiovascular disease in Type II diabetes: the epidemiological evidence." Diabetologia **44**(12): 2107-14.

Boquist S, Ruotolo G, Tang R, Bjorkegren J, Bond MG, de Faire U, Karpe F et Hamsten A (1999). "Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men." Circulation **100**(7): 723-8.

Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Williams RR, Ellison RC et Selhub J (1995). "Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study." Atherosclerosis **116**(1): 147-51.

Bourgoin F, Bachelard H, Badeau M, Melancon S, Pitre M, Lariviere R et Nadeau A (2008). "Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(3): H1044-H1055.

Bowen J, Noakes M et Clifton P (2003). "The effect of protein source (dairy vs mixed) in high protein, energy restricted diets on body composition, vascular health and metabolic markers in overweight adults." Asia Pac J Clin Nutr **12 Suppl**: S9.

Bredt DS et Snyder SH (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-5.

Brevetti G, Schiano V et Chiariello M (2008). "Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease?" Atherosclerosis **197**(1): 1-11.
Brosnan JT et Brosnan ME (2006). "The sulfur-containing amino acids: an overview." J Nutr **136**(6 Suppl): 1636S-1640S.
Brown AA et Hu FB (2001). "Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease." Am J Clin Nutr **73**(4): 673-86.
Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S et Webb DJ (2005). "Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension." J Hypertens **23**(2): 233-46.
Bryan NS (2006). "Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review." Free Radic Biol Med **41**(5): 691-701.
Bryan NS et Grisham MB (2007). "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples." Free Radic Biol Med **43**(5): 645-57.
Burdge GC et Calder PC (2005). "Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease?" Br J Nutr **93**(1): 3-9.
Burnstock G (1999). "Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction." J Anat **194 (Pt 3)**: 335-42.
Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM et Weston AH (2002). "EDHF: bringing the concepts together." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 374-80.
Busse R et Fleming I (2003). "Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces." Trends Pharmacol Sci **24**(1): 24-9.
Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS et Cooke JP (1996). "Regression or progression. Dependency on vascular nitric oxide." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(1): 44-50.
Cannon RO, 3rd (1998). "Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium." Clin Chem **44**(8 Pt 2): 1809-19.
Carpentier YA, Portois L et Malaisse WJ (2006). "n-3 fatty acids and the metabolic syndrome." Am J Clin Nutr **83**(6 Suppl): 1499S-1504S.
Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP et Weiner CP (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." J Cell Physiol **184**(3): 409-20.
Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P et Hingorani AD (2005). "Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation." The Lancet **365**(9455): 224-232.
Castillo L, Sanchez M, Vogt J, Chapman TE, DeRojas-Walker TC, Tannenbaum SR, Ajami AM et Young VR (1995). "Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis." Am J Physiol **268**(2 Pt 1): E360-7.
Castillo L, Beaumier L, Ajami AM et Young VR (1996). "Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11460-5.
Cavalot F, Petrelli A, Traversa M, Bonomo K, Fiora E, Conti M, Anfossi G, Costa G et Trovati M (2006). "Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus, particularly in women: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study." J Clin Endocrinol Metab **91**(3): 813-9.
Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK et Deanfield JE (1992). "Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis." Lancet **340**(8828): 1111-5.
Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, Tonutti L et Taboga C (1998). "Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients." Diabetes Care **21**(9): 1529-33.
Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, Marra G, Tonutti L, Taboga C et Motz E (2002a). "Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation." Diabetes Care **25**(8): 1439-43.
Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R et Motz E (2002b). "Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment." Circulation **106**(10): 1211-8.
Ceriello A (2003). "The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications." Diabetologia **46 Suppl 1**: M9-16.
Ceriello A et Motz E (2004). "Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(5): 816-23.

Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Esposito K et Giugliano D (2004). "Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment." Diabetes **53**(3): 701-10.

Ceriello A (2008). "Cardiovascular effects of acute hyperglycaemia: pathophysiological underpinnings." Diab Vasc Dis Res **5**(4): 260-8.

Chambers JC, Obeid OA et Kooner JS (1999). "Physiological increments in plasma homocysteine induce vascular endothelial dysfunction in normal human subjects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(12): 2922-7.

Chan JR, Boger RH, Bode-Boger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF et Cooke JP (2000). "Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): 1040-6.

Chandra RK (1997). "Nutrition and the immune system: an introduction." Am J Clin Nutr **66**(2): 460S-463S.

Charakida M, Deanfield J et Halcox J (2006). "The role of nitric oxide in early atherosclerosis." European Journal of Clinical Pharmacology **62**(0): 69-78.

Charkoudian N, Vella A, Reed AS, Minson CT, Shah P, Rizza RA et Joyner MJ (2002). "Cutaneous vascular function during acute hyperglycemia in healthy young adults." J Appl Physiol **93**(4): 1243-50.

Chatterjee A et Catravas JD (2008). "Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation." Vascul Pharmacol **49**(4-6): 134-40.

Chen J, Kuhlencordt P, Urano F, Ichinose H, Astern J et Huang PL (2003). "Effects of chronic treatment with L-arginine on atherosclerosis in apoE knockout and apoE/inducible NO synthase double-knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 97-103.

Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA et FitzGerald GA (2002). "Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2." Science **296**(5567): 539-41.

Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A et Laakso M (2002). "Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial." Lancet **359**(9323): 2072-7.

Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A et Laakso M (2003). "Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial." Jama **290**(4): 486-94.

Chin-Dusting JP, Alexander CT, Arnold PJ, Hodgson WC, Lux AS et Jennings GL (1996a). "Effects of in vivo and in vitro L-arginine supplementation on healthy human vessels." J Cardiovasc Pharmacol **28**(1): 158-66.

Chin-Dusting JP, Kaye DM, Lefkovits J, Wong J, Bergin P et Jennings GL (1996b). "Dietary supplementation with L-arginine fails to restore endothelial function in forearm resistance arteries of patients with severe heart failure." J Am Coll Cardiol **27**(5): 1207-13.

Chowienczyk PJ, Watts GF, Wierzbicki AS, Cockcroft JR, Brett SE et Ritter JM (1997). "Preserved endothelial function in patients with severe hypertriglyceridemia and low functional lipoprotein lipase activity." J Am Coll Cardiol **29**(5): 964-8.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM et Stern DM (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood **91**(10): 3527-61.

Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE, McCredie R, Robinson J, McCarthy SN, Keech A, Celermajer DS et Deanfield JE (1996). "Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults." J Clin Invest **97**(8): 1989-94.

Clarkson TB (2002). "Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease." J Nutr **132**(3): 566S-569S.

Closs EI, Simon A, Vekony N et Rotmann A (2004). "Plasma membrane transporters for arginine." J Nutr **134**(10 Suppl): 2752S-2759S; discussion 2765S-2767S.

Constans J et Conri C (2006). "Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease." Clin Chim Acta **368**(1-2): 33-47.

Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT et Creager MA (1991a). "Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta." Circulation **83**(3): 1057-62.

Cooke JP, Dzau J et Creager A (1991b). "Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine." Basic Res Cardiol **86 Suppl 2**: 173-81.

Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA et Billingham ME (1992). "Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit." J Clin Invest **90**(3): 1168-72.

Cortes B, Nunez I, Cofan M, Gilabert R, Perez-Heras A, Casals E, Deulofeu R et Ros E (2006). "Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function." J Am Coll Cardiol **48**(8): 1666-71.

Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P et Selwyn AP (1989). "Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans." Circulation **80**(3): 458-65.

Cuevas AM, Irribarra VL, Castillo OA, Yanez MD et Germain AM (2003). "Isolated soy protein improves endothelial function in postmenopausal hypercholesterolemic women." Eur J Clin Nutr **57**(8): 889-94.
Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T et Shimamoto T (2007). "Metabolic syndrome and urinary cGMP excretion in general population." Atherosclerosis **190**(2): 423-8.
Daly M (2003). "Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state." Am J Clin Nutr **78**(4): 865S-872S.
Davignon J et Ganz P (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.
Dayal S et Lentz SR (2007). "Role of redox reactions in the vascular phenotype of hyperhomocysteinemic animals." Antioxid Redox Signal **9**(11): 1899-909.
Dayal S, Rodionov RN, Arning E, Bottiglieri T, Kimoto M, Murry DJ, Cooke JP, Faraci FM et Lentz SR (2008). "Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(2): H816-25.
Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ et Cooke JP (2003). "Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence." Circulation **108**(24): 3042-7.
De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA et Blom HJ (2002). "Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease." Pharmacol Rev **54**(4): 599-618.
De Caterina R, Zampolli A, Del Turco S, Madonna R et Massaro M (2006). "Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease." Am J Clin Nutr **83**(2): 421S-426S.
de Jong SC, Stehouwer CD, van den Berg M, Kostense PJ, Alders D, Jakobs C, Pals G et Rauwerda JA (1999). "Determinants of fasting and post-methionine homocysteine levels in families predisposed to hyperhomocysteinemia and premature vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1316-24.
de Koning EJ et Rabelink TJ (2002). "Endothelial function in the post-prandial state." Atheroscler Suppl **3**(1): 11-6.
de Kreutzenberg SV, Crepaldi C, Marchetto S, Calo L, Tiengo A, Del Prato S et Avogaro A (2000). "Plasma free fatty acids and endothelium-dependent vasodilation: effect of chain-length and cyclooxygenase inhibition." J Clin Endocrinol Metab **85**(2): 793-8.
de Kreutzenberg SV, Puato M, Kiwanuka E, Del Prato S, Pauletto P, Pasini L, Tiengo A et Avogaro A (2003). "Elevated non-esterified fatty acids impair nitric oxide independent vasodilation, in humans: evidence for a role of inwardly rectifying potassium channels." Atherosclerosis **169**(1): 147-53.
De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Proietti A, De Luca O, Armiento A et Ferri C (1998). "Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with non-insulin-dependent diabetes." Diabetologia **41**(11): 1392-6.
de Roos NM, Siebelink E, Bots ML, van Tol A, Schouten EG et Katan MB (2002). "Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation." Eur J Clin Nutr **56**(7): 674-9.
Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S et Webb DJ (2005). "Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension." J Hypertens **23**(1): 7-17.
Deanfield JE, Halcox JP et Rabelink TJ (2007). "Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance." Circulation **115**(10): 1285-95.
den Heijer M, Willems HP, Blom HJ, Gerrits WB, Cattaneo M, Eichinger S, Rosendaal FR et Bos GM (2007). "Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial." Blood **109**(1): 139-44.
Derakhshan B, Hao G et Gross SS (2007). "Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide." Cardiovasc Res **75**(2): 210-9.
Devaraj S, Xu DY et Jialal I (2003). "C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis." Circulation **107**(3): 398-404.
Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL et Jialal I (2008). "High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome." Metabolism **57**(6): 867-70.
Devaraj S, Singh U et Jialal I (2009). "The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis." Clin Chem **55**(2): 229-38.
Dikalov S, Griendling KK et Harrison DG (2007). "Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies." Hypertension **49**(4): 717-27.

Djousse L, Ellison RC, McLennan CE, Cupples LA, Lipinska I, Tofler GH, Gokce N et Vita JA (1999). "Acute effects of a high-fat meal with and without red wine on endothelial function in healthy subjects." Am J Cardiol **84**(6): 660-4.

Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, Oka H, Ogata N, Hirata A, Yamamoto Y et Yasue H (1999). "Membrane active lipids in remnant lipoproteins cause impairment of endothelium-dependent vasorelaxation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(8): 1918-24.

Donald AE, Halcox JP, Charakida M, Storry C, Wallace SM, Cole TJ, Friberg P et Deanfield JE (2008). "Methodological approaches to optimize reproducibility and power in clinical studies of flow-mediated dilation." J Am Coll Cardiol **51**(20): 1959-64.

Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, Stabler S, Boger R, Allen R, Newcombe R, Lewis M et Moat S (2005). "Relationship between S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia." Metabolism **54**(3): 351-60.

Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ et Goodfellow J (2001). "Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide." Clin Sci (Lond) **101**(6): 629-35.

Duncan MW (2003). "A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine." Amino Acids **25**(3-4): 351-61.

Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S et Blache D (2001). "Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease." Lab Invest **81**(5): 645-72.

El-Khairy L, Ueland PM, Refsum H, Graham IM et Vollset SE (2001). "Plasma total cysteine as a risk factor for vascular disease: The European Concerted Action Project." Circulation **103**(21): 2544-9.

El-Khairy L, Vollset SE, Refsum H et Ueland PM (2003). "Plasma total cysteine, mortality, and cardiovascular disease hospitalizations: the Hordaland Homocysteine Study." Clin Chem **49**(6 Pt 1): 895-900.

Elahi MM, Naseem KM et Matata BM (2007). "Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease." Febs J **274**(4): 906-23.

Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R et Giugliano D (2003). "Effect of dietary antioxidants on postprandial endothelial dysfunction induced by a high-fat meal in healthy subjects." Am J Clin Nutr **77**(1): 139-43.

Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F et Giugliano D (2004). "Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial." Jama **292**(12): 1440-6.

Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S et Cannon PJ (2000). "Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(9): 2039-44.

Feldeisen SE et Tucker KL (2007). "Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome." Appl Physiol Nutr Metab **32**(1): 46-60.

Feletou M, Busse R, Edwards G, Fleming I, Weston AH et Vanhoutte PM (2003). "[Communication between endothelial and smooth muscle cells]." Med Sci (Paris) **19**(12): 1242-50.

Feletou M et Vanhoutte PM (2004). "EDHF: new therapeutic targets?" Pharmacol Res **49**(6): 565-80.

Feletou M et Vanhoutte PM (2006). "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(3): H985-1002.

Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, Alecy LD et DiPetrillo K (2008). "Validation of Volume-Pressure Recording Tail-Cuff Blood Pressure Measurements." Am J Hypertens **21**(12): 1288-1291.

Ferrara LA, Innelli P, Palmieri V, Limauro S, De Luca G, Ferrara F, Liccardo E et Celentano A (2006). "Effects of different dietary protein intakes on body composition and vascular reactivity." Eur J Clin Nutr **60**(5): 643-9.

Ferreira AC, Peter AA, Mendez AJ, Jimenez JJ, Mauro LM, Chirinos JA, Ghany R, Virani S, Garcia S, Horstman LL, Purow J, Jy W, Ahn YS et de Marchena E (2004). "Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles." Circulation **110**(23): 3599-603.

Fielding BA, Callow J, Owen RM, Samra JS, Matthews DR et Frayn KN (1996). "Postprandial lipemia: the origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals." Am J Clin Nutr **63**(1): 36-41.

Finkelstein JD (2007). "Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine." Clin Chem Lab Med **45**(12): 1694-9.

Fleming I et Busse R (2003). "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(1): R1-12.

Fleming RM (2000). "The effect of high-protein diets on coronary blood flow." Angiology **51**(10): 817-26.

Ford ES, Giles WH et Mokdad AH (2004). "Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults." Diabetes Care **27**(10): 2444-9.

Forstermann U et Munzel T (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-14.
Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J et Benjamin N (1997). "Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension." Lancet **349**(9055): 837-42.
Frank PG, Woodman SE, Park DS et Lisanti MP (2003). "Caveolin, caveolae, and endothelial cell function." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1161-8.
Frayn KN (2002). "Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux." Diabetologia **45**(9): 1201-10.
Friebe A et Koesling D (2003). "Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." Circ Res **93**(2): 96-105.
Fu YF, Xiong Y et Guo Z (2005). "A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats." Eur J Pharmacol **508**(1-3): 167-75.
Fukagawa NK, Ajami AM et Young VR (1996). "Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans." Am J Physiol **270**(2 Pt 1): E209-14.
Fukagawa NK (2006). "Sparing of methionine requirements: evaluation of human data takes sulfur amino acids beyond protein." J Nutr **136**(6 Suppl): 1676S-1681S.
Furchgott RF et Zawadzki JV (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
Furchgott RF (1999). "Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide." Biosci Rep **19**(4): 235-51.
Gaenzer H, Sturm W, Neumayr G, Kirchmair R, Ebenbichler C, Ritsch A, Foger B, Weiss G et Patsch JR (2001). "Pronounced postprandial lipemia impairs endothelium-dependent dilation of the brachial artery in men." Cardiovasc Res **52**(3): 509-16.
Galkina E et Ley K (2007). "Vascular adhesion molecules in atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2292-301.
Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrova N, Abukhalaf IK et Bayorh MA (2002). "Acute inhibition of glutathione biosynthesis alters endothelial function and blood pressure in rats." Eur J Pharmacol **454**(2-3): 217-23.
Gannon MC, Nuttall JA et Nuttall FQ (2002). "Oral arginine does not stimulate an increase in insulin concentration but delays glucose disposal." Am J Clin Nutr **76**(5): 1016-22.
Ghafourifar P et Cadenas E (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase." Trends Pharmacol Sci **26**(4): 190-5.
Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C et D'Onofrio F (1997). "Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia." Circulation **95**(7): 1783-90.
Giugliano D, Ceriello A et Esposito K (2008). "Glucose metabolism and hyperglycemia." Am J Clin Nutr **87**(1): 217S-222S.
Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R et Harrison R (2000). "Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase." J Biol Chem **275**(11): 7757-63.
Gokce N, Duffy SJ, Hunter LM, Keaney JF et Vita JA (2001). "Acute hypertriglyceridemia is associated with peripheral vasodilation and increased basal flow in healthy young adults." Am J Cardiol **88**(2): 153-9.
Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC et Tanus-Santos JE (2008). "Enhanced concentrations of relevant markers of nitric oxide formation after exercise training in patients with metabolic syndrome." Nitric Oxide **19**(4): 345-50.
Gornik HL et Creager MA (2004). "Arginine and endothelial and vascular health." J Nutr **134**(10 Suppl): 2880S-2887S; discussion 2895S.
Graier WF, Posch K, Fleischhacker E, Wascher TC et Kostner GM (1999). "Increased superoxide anion formation in endothelial cells during hyperglycemia: an adaptive response or initial step of vascular dysfunction?" Diabetes Res Clin Pract **45**(2-3): 153-60.
Grau M, Hendgen-Cotta UB, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M et Kleinbongard P (2007). "Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **851**(1-2): 106-23.
Gronholdt ML, Nordestgaard BG, Nielsen TG et Sillesen H (1996). "Echolucent carotid artery plaques are associated with elevated levels of fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins." Stroke **27**(12): 2166-72.
Grover-Paez F et Zavalza-Gomez AB (2009). "Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors." Diabetes Res Clin Pract.
Grundy SM (2007). "Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor." J Clin Endocrinol Metab **92**(2): 399-404.

Gudmundsson GS, Sinkey CA, Chenard CA, Stumbo PJ et Haynes WG (2000). "Resistance vessel endothelial function in healthy humans during transient postprandial hypertriglyceridemia." Am J Cardiol **85**(3): 381-5.

Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX et Smith U (2007). "Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2276-83.

Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR et Quyyumi AA (2002). "Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction." Circulation **106**(6): 653-8.

Hallemeesch MM, Lamers WH et Deutz NE (2002). "Reduced arginine availability and nitric oxide production." Clin Nutr **21**(4): 273-9.

Hambrecht R, Hilbrich L, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Schoene N et Schuler G (2000). "Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation." J Am Coll Cardiol **35**(3): 706-13.

Hanley AJ, Festa A, D'Agostino RB, Jr., Wagenknecht LE, Savage PJ, Tracy RP, Saad MF et Haffner SM (2004). "Metabolic and inflammation variable clusters and prediction of type 2 diabetes: factor analysis using directly measured insulin sensitivity." Diabetes **53**(7): 1773-81.

Hanratty CG, McAuley DF, McGrath LT, Young IS et Johnston GD (2001a). "Hyperhomocysteinaemia in young adults is not associated with impaired endothelial function." Clin Sci (Lond) **100**(1): 67-72.

Hanratty CG, McGrath LT, McAuley DF, Young IS et Johnston DG (2001b). "The effect on endothelial function of vitamin C during methionine induced hyperhomocysteinaemia." BMC Cardiovasc Disord **1**(1): 1.

Hansell J, Henareh L, Agewall S et Norman M (2004). "Non-invasive assessment of endothelial function - relation between vasodilatory responses in skin microcirculation and brachial artery." Clin Physiol Funct Imaging **24**(6): 317-22.

Hanson MA et Gluckman PD (2005). "Developmental processes and the induction of cardiovascular function: conceptual aspects." J Physiol **565**(Pt 1): 27-34.

Hare JM et Stamler JS (2005). "NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system." J Clin Invest **115**(3): 509-17.

Harrison DG (1997). "Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction." J Clin Invest **100**(9): 2153-7.

Heiss C, Lauer T, Dejam A, Kleinbongard P, Hamada S, Rassaf T, Matern S, Feelisch M et Kelm M (2006). "Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction." J Am Coll Cardiol **47**(3): 573-9.

Heiss C, Sievers RE, Amabile N, Momma TY, Chen Q, Natarajan S, Yeghiazarians Y et Springer ML (2008). "In vivo measurement of flow-mediated vasodilation in living rats using high-resolution ultrasound." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(2): H1086-93.

Hendgen-Cotta U, Grau M, Rassaf T, Gharini P, Kelm M et Kleinbongard P (2008). "Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of the nitric oxide pool in biological matrices." Methods Enzymol **441**: 295-315.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE et Stamler JS (2005). "Protein S-nitrosylation: purview and parameters." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 150-66.

Hokanson JE et Austin MA (1996). "Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies." J Cardiovasc Risk **3**(2): 213-9.

Holm P, Korsgaard N, Shalmi M, Andersen HL, Hougaard P, Skouby SO et Stender S (1997). "Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits." J Clin Invest **100**(4): 821-8.

Houben AJ, Schaper NC, de Haan CH, Huvers FC, Slaaf DW, de Leeuw PW et Nieuwenhuijzen Kruseman C (1996). "Local 24-h hyperglycemia does not affect endothelium-dependent or -independent vasoreactivity in humans." Am J Physiol **270**(6 Pt 2): H2014-20.

Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG et Willett WC (2001). "Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women." N Engl J Med **345**(11): 790-7.

Huneau JF, Mariotti F, Blouet C, Tome D et Blachier F (2008). Implications métaboliques, physiologiques et fonctionnelles de l'apport en acides aminés soufrés et en protéines riches en acides aminés soufrés. Aliments fonctionnels (2ieme édition). M. Roberfroid, V. Coxam et N. Delzenne. Paris, Lavoisier.

Ihlemann N, Rask-Madsen C, Perner A, Dominguez H, Hermann T, Kober L et Torp-Pedersen C (2003). "Tetrahydrobiopterin restores endothelial dysfunction induced by an oral glucose challenge in healthy subjects." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H875-82.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H et Nawata H (2000). "High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells." Diabetes **49**(11): 1939-45.

Itoh S, Brawley L, Wheeler T, Anthony FW, Poston L et Hanson MA (2002). "Vasodilation to vascular endothelial growth factor in the uterine artery of the pregnant rat is blunted by low dietary protein intake." Pediatr Res **51**(4): 485-91.
Jackson KG, Armah CK et Minihane AM (2007). "Meal fatty acids and postprandial vascular reactivity." Biochem Soc Trans **35**(Pt 3): 451-3.
Jamison RL, Hartigan P, Kaufman JS, Goldfarb DS, Warren SR, Guarino PD et Gaziano JM (2007). "Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease: a randomized controlled trial." Jama **298**(10): 1163-70.
Joannides R, Bellien J et Thuillez C (2006). "Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries." Fundam Clin Pharmacol **20**(3): 311-20.
Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ et Wu G (2006). "Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates." J Nutr Biochem **17**(9): 571-88.
Jones DP (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1865-79.
Kahn R, Buse J, Ferrannini E et Stern M (2005). "The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **28**(9): 2289-304.
Karpe F (1997). "Effects of diet on postprandial lipaemia: a suggestion for methodological standardization." Nutr Metab Cardiovasc Dis **7**.
Karpe F (1999). "Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis." J Intern Med **246**(4): 341-55.
Katagiri H, Yamada T et Oka Y (2007). "Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals." Circ Res **101**(1): 27-39.
Katan MB, Zock PL et Mensink RP (1995). "Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease." Am J Clin Nutr **61**(6 Suppl): 1368S-1373S.
Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C et Rubanyi GM (2000). "Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(5): H1679-85.
Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H et Yasue H (1999). "Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery." J Am Coll Cardiol **34**(1): 146-54.
Kawashima S et Yokoyama M (2004). "Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 998-1005.
Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ et Chin-Dusting JP (2000). "In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure." Circulation **102**(22): 2707-12.
Kaye DM, Parnell MM et Ahlers BA (2002). "Reduced myocardial and systemic L-arginine uptake in heart failure." Circ Res **91**(12): 1198-203.
Kearney MT, Duncan ER, Kahn M et Wheatcroft SB (2008). "Insulin resistance and endothelial cell dysfunction: studies in mammalian models." Exp Physiol **93**(1): 158-63.
Kemp M, Go YM et Jones DP (2008). "Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology." Free Radic Biol Med **44**(6): 921-37.
Kershaw EE et Flier JS (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2548-56.
Kim JA, Montagnani M, Koh KK et Quon MJ (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." Circulation **113**(15): 1888-904.
Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Godecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M et Kelm M (2003). "Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals." Free Radic Biol Med **35**(7): 790-6.
Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M et Kelm M (2006a). "Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans." Free Radic Biol Med **40**(2): 295-302.
Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P et Kelm M (2006b). "Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase." Blood **107**(7): 2943-51.
Kleinbongard P, Keymel S et Kelm M (2007). "New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood." Thromb Haemost **98**(5): 970-4.
Kleinert H, Pautz A, Linker K et Schwarz PM (2004). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 255-66.
Kleschyov AL, Wenzel P et Munzel T (2007). "Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **851**(1-2): 12-20.
Klumpp G, Schildknecht S, Nastainczyk W, Ullrich V et Bachschmid M (2005). "Prostacyclin in the cardiovascular system: new aspects and open questions." Pharmacol Rep **57 Suppl**: 120-6.

Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A et Imig JD (2008). "Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet." Hypertension **51**(2): 352-9.

Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A et van Staveren WA (2004). "Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project." Jama **292**(12): 1433-9.

Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O et Maeda N (2000). "Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment." J Clin Invest **105**(4): 451-8.

Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W et Yu ZY (2003). "Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide." Am J Physiol Renal Physiol **285**(2): F178-90.

Koumentaki A, Anthony F, Poston L et Wheeler T (2002). "Low-protein diet impairs vascular relaxation in virgin and pregnant rats." Clin Sci (Lond) **102**(5): 553-60.

Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, Han F, Preffer F, Rosenzweig A, Sessa WC, Gimbrone MA, Jr., Ertl G et Huang PL (2004). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **286**(5): C1195-202.

Lairon D, Lopez-Miranda J et Williams C (2007). "Methodology for studying postprandial lipid metabolism." Eur J Clin Nutr **61**(10): 1145-61.

Landmesser U, Hornig B et Drexler H (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" Circulation **109**(21 Suppl 1): II27-33.

Larose E et Ganz P (2004). "Statins and endothelial dysfunction." Semin Vasc Med **4**(4): 333-46.

Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M et Kelm M (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12814-9.

Lauer T, Kleinbongard P et Kelm M (2002). "Indexes of NO bioavailability in human blood." News Physiol Sci **17**: 251-5.

Lavigne C, Marette A et Jacques H (2000). "Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(3): E491-500.

Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H et Marette A (2001). "Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(1): E62-71.

Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P et Megson IL (2008). "Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities." Antioxid Redox Signal **10**(9): 1631-74.

Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr. et Ratan RR (2003). "Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4843-8.

Leiper J et Vallance P (2006). "The synthesis and metabolism of asymmetric dimethylarginine (ADMA)." European Journal of Clinical Pharmacology **62**(0): 33-38.

Lentz SR, Rodionov RN et Dayal S (2003). "Hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular risk: the potential role of ADMA." Atheroscler Suppl **4**(4): 61-5.

Lentz SR et Haynes WG (2004). "Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor?" Cleve Clin J Med **71**(9): 729-34.

Lentz SR (2005). "Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis." J Thromb Haemost **3**(8): 1646-54.

Lerman A, Burnett JC, Jr., Higano ST, McKinley LJ et Holmes DR, Jr. (1998). "Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans." Circulation **97**(21): 2123-8.

Li H et Sun B (2007). "Toll-like receptor 4 in atherosclerosis." J Cell Mol Med **11**(1): 88-95.

Libby P (2007). "Fat fuels the flame: triglyceride-rich lipoproteins and arterial inflammation." Circ Res **100**(3): 299-301.

Lin CC, Tsai WC, Chen JY, Li YH, Lin LJ et Chen JH (2008). "Supplements of L-arginine attenuate the effects of high-fat meal on endothelial function and oxidative stress." Int J Cardiol **127**(3): 337-41.

Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M et Scherer PE (2005). "The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species." J Biol Chem **280**(6): 4617-26.

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C et Genest J, Jr. (2006). "Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease." N Engl J Med **354**(15): 1567-77.

Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT, Meigs JB, Rifai N, Manson JE et Hu FB (2004). "Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction." Am J Clin Nutr **80**(4): 1029-35.

Loscalzo J (2004). "L-arginine and atherothrombosis." J Nutr **134**(10 Suppl): 2798S-2800S; discussion 2818S-2819S.

Loscalzo J (2006). "Homocysteine trials--clear outcomes for complex reasons." N Engl J Med **354**(15): 1629-32.

Lu SC (2008). "Regulation of glutathione synthesis." Mol Aspects Med.

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW et Ganz P (1986). "Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries." N Engl J Med **315**(17): 1046-51.

Luiking YC et Deutz NE (2003). "Isotopic investigation of nitric oxide metabolism in disease." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **6**(1): 103-8.

Lundberg JO et Weitzberg E (2005). "NO generation from nitrite and its role in vascular control." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 915-22.

Lundberg JO, Weitzberg E et Gladwin MT (2008). "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 156-67.

Lundman P, Eriksson M, Schenck-Gustafsson K, Karpe F et Tornvall P (1997). "Transient triglyceridemia decreases vascular reactivity in young, healthy men without risk factors for coronary heart disease." Circulation **96**(10): 3266-8.

Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Yu YM, Lu XM, Zurakowski D, Tompkins RG, Ajami AM, Young VR et Castillo L (2000). "Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5071-6.

Maas R, Schwedhelm E, Kahl L, Li H, Benndorf R, Luneburg N, Forstermann U et Boger RH (2008). "Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia." Clin Chem **54**(2): 292-300.

Maggi FM, Raselli S, Grigore L, Redaelli L, Fantappie S et Catapano AL (2004). "Lipoprotein remnants and endothelial dysfunction in the postprandial phase." J Clin Endocrinol Metab **89**(6): 2946-50.

Mair J et Puschendorf B (1998). "Is measurement of cyclic guanosine monophosphate in plasma or urine suitable for assessing in vivo nitric oxide production?" Circulation **97**(12): 1209-10.

Major-Pedersen A, Ihlemann N, Hermann TS, Christiansen B, Dominguez H, Kveiborg B, Nielsen DB, Svendsen OL, Kober L et Torp-Pedersen C (2008). "Effects of oral glucose load on endothelial function and on insulin and glucose fluctuations in healthy individuals." Exp Diabetes Res **2008**: 672021.

Marchesi S, Lupattelli G, Schillaci G, Pirro M, Siepi D, Roscini AR, Pasqualini L et Mannarino E (2000). "Impaired flow-mediated vasoactivity during post-prandial phase in young healthy men." Atherosclerosis **153**(2): 397-402.

Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Roscini AR, Vaudo G, Sinzinger H et Mannarino E (2001). "Oral L-arginine administration attenuates postprandial endothelial dysfunction in young healthy males." J Clin Pharm Ther **26**(5): 343-9.

Mariotti F, Simbelie KL, Makarios-Lahham L, Huneau JF, Laplaize B, Tome D et Even PC (2004). "Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content." J Nutr **134**(1): 128-31.

Mariotti F, Hammiche A, Blouet C, Dare S, Tome D et Huneau JF (2006). "Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline." Eur J Nutr **45**(7): 383-90.

Mariotti F, Huneau JF, Szezepanski I, Petzke KJ, Aggoun Y, Tome D et Bonnet D (2007). "Meal amino acids with varied levels of arginine do not affect postprandial vascular endothelial function in healthy young men." J Nutr **137**(6): 1383-9.

Mariotti F, Hermier D, Sarrat C, Magne J, Fenart E, Evrard J, Tome D et Huneau JF (2008). "Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats." Br J Nutr: 1-8.

Mariotti F, Petzke KJ, Huneau JF, Szezepanski I, Tome D, Bos C et Bonnet D (2009). "Despite a large first-pass extraction for urea synthesis, the systemic bioavailability of meal arginine is high and dose-dependent in men." FASEB J. **23**(1_MeetingAbstracts): 738.1-.

Martinez MC et Andriantsitohaina R (2009). "Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease." Antioxidants & Redox Signaling **11**(3): 669.

Matthan NR, Jalbert SM, Ausman LM, Kuvin JT, Karas RH et Lichtenstein AH (2007). "Effect of soy protein from differently processed products on cardiovascular disease risk factors and vascular endothelial function in hypercholesterolemic subjects." Am J Clin Nutr **85**(4): 960-6.

Maxwell AJ (2002). "Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases." Nitric Oxide **6**(2): 101-24.
McCully KS (1969). "Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis." Am J Pathol **56**(1): 111-28.
McDonald KK, Zharikov S, Block ER et Kilberg MS (1997). "A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox"." J Biol Chem **272**(50): 31213-6.
Medzhitov R (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." Nature **454**(7203): 428-35.
Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM et Singer DE (1997). "Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study." Diabetes **46**(10): 1594-600.
Meigs JB (2000). "Invited commentary: insulin resistance syndrome? Syndrome X? Multiple metabolic syndrome? A syndrome at all? Factor analysis reveals patterns in the fabric of correlated metabolic risk factors." Am J Epidemiol **152**(10): 908-11; discussion 912.
Melikian N, Chowienczyk P, MacCarthy PA, Williams IL, Wheatcroft SB, Sherwood R, Gale C, Shah AM et Kearney MT (2008). "Determinants of endothelial function in asymptomatic subjects with and without the metabolic syndrome." Atherosclerosis **197**(1): 375-82.
Michiels C (2003). "Endothelial cell functions." J Cell Physiol **196**(3): 430-43.
Moat SJ, Bonham JR et Powers HJ (2001). "Role of aminothiols as a component of the plasma antioxidant system and relevance to homocysteine-mediated vascular disease." Clin Sci (Lond) **100**(1): 73-9.
Moncada S et Higgs EA (2006). "The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S193-201.
Mori M et Gotoh T (2004). "Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection." J Nutr **134**(10 Suppl): 2820S-2825S; discussion 2853S.
Moriarty-Craige SE et Jones DP (2004). "EXTRACELLULAR THIOLS AND THIOL/DISULFIDE REDOX IN METABOLISM." Annual Review of Nutrition **24**(1): 481-509.
Morris SM, Jr. (2002). "Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism." Annu Rev Nutr **22**: 87-105.
Morris SM, Jr. (2004). "Enzymes of arginine metabolism." J Nutr **134**(10 Suppl): 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.
Morris SM, Jr. (2006). "Arginine: beyond protein." Am J Clin Nutr **83**(2): 508S-512S.
Moshage H, Kok B, Huizenga JR et Jansen PL (1995). "Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation." Clin Chem **41**(6 Pt 1): 892-6.
Moshage H (1997). "Nitric oxide determinations: much ado about NO.-thing?" Clin Chem **43**(4): 553-6.
Mozaffarian D, Wilson PW et Kannel WB (2008). "Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease." Circulation **117**(23): 3031-8.
Mudd SH, Brosnan JT, Brosnan ME, Jacobs RL, Stabler SP, Allen RH, Vance DE et Wagner C (2007). "Methyl balance and transmethylation fluxes in humans." Am J Clin Nutr **85**(1): 19-25.
Mugge A, Brandes RP, Boger RH, Dwenger A, Bode-Boger S, Kienke S, Frolich JC et Lichtlen PR (1994). "Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits." J Cardiovasc Pharmacol **24**(6): 994-8.
Munzel T, Daiber A, Ullrich V et Mulsch A (2005). "Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(8): 1551-7.
Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R et Giugliano D (2002). "Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals." J Am Coll Cardiol **39**(7): 1145-50.
Naseem KM (2005). "The role of nitric oxide in cardiovascular diseases." Mol Aspects Med **26**(1-2): 33-65.
Nathan C (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-52.
NCEP-report (2002). "Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report." Circulation **106**(25): 3143-421.
Neri S, Signorelli SS, Torrisi B, Pulvirenti D, Mauceri B, Abate G, Ignaccolo L, Bordonaro F, Cilio D, Calvagno S et Leotta C (2005). "Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls." Clin Ther **27**(11): 1764-73.
Ng CK, Chan AP et Cheng A (2001). "Impairment of endothelial function--a possible mechanism for atherosclerosis of a high-fat meal intake." Ann Acad Med Singapore **30**(5): 499-502.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I et Brownlee M (2000). "Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage." Nature **404**(6779): 787-90.

Norata GD, Grigore L, Raselli S, Seccomandi PM, Hamsten A, Maggi FM, Eriksson P et Catapano AL (2006). "Triglyceride-rich lipoproteins from hypertriglyceridemic subjects induce a pro-inflammatory response in the endothelium: Molecular mechanisms and gene expression studies." J Mol Cell Cardiol **40**(4): 484-94.

Norata GD et Catapano AL (2007). "Triglyceride-rich lipoproteins from normotrygliceridemic subjects and hyperlipidemic patients differently affect endothelial cell activation and gene expression patterns." Circ Res **100**(7): e81.

Norata GD, Grigore L, Raselli S, Redaelli L, Hamsten A, Maggi F, Eriksson P et Catapano AL (2007). "Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies." Atherosclerosis **193**(2): 321-7.

O'Keefe JH et Bell DS (2007). "Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor." Am J Cardiol **100**(5): 899-904.

Ohara Y, Peterson TE et Harrison DG (1993). "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production." J Clin Invest **91**(6): 2546-51.

Oliver JJ et Webb DJ (2003). "Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(4): 554-66.

Otsuka A, Azuma K, Iesaki T, Sato F, Hirose T, Shimizu T, Tanaka Y, Daida H, Kawamori R et Watada H (2005). "Temporary hyperglycaemia provokes monocyte adhesion to endothelial cells in rat thoracic aorta." Diabetologia **48**(12): 2667-74.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M et Yokoyama M (2002). "Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice." J Clin Invest **110**(3): 331-40.

Ozuyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW et Kleinbongard P (2008). "RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects." Trends Mol Med **14**(7): 314-22.

Pacher P, Beckman JS et Liaudet L (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.

Padilla J, Harris RA, Fly AD, Rink LD et Wallace JP (2006). "The effect of acute exercise on endothelial function following a high-fat meal." Eur J Appl Physiol **98**(3): 256-62.

Papatheodorou L et Weiss N (2007). "Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia." Antioxid Redox Signal **9**(11): 1941-58.

Parodi O, De Chiara B, Baldassarre D, Parolini M, Caruso R, Pustina L, Parodi G, Campolo J, Sedda V, Baudo F et Sirtori C (2007). "Plasma cysteine and glutathione are independent markers of postmethionine load endothelial dysfunction." Clin Biochem **40**(3-4): 188-93.

Pechanova O, Zicha J, Kojsova S, Dobesova Z, Jendekova L et Kunes J (2006). "Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension." Clin Sci (Lond) **110**(2): 235-42.

Perkins ND (2006). "Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway." Oncogene **25**(51): 6717-30.

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P et Schillaci G (2001). "Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients." Circulation **104**(2): 191-6.

Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, Tripepi G, Sesti G et Zoccali C (2005). "Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension." J Am Coll Cardiol **46**(3): 518-23.

Peschel T et Niebauer J (2003). "Role of pro-atherogenic adhesion molecules and inflammatory cytokines in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2." Cytometry B Clin Cytom **53**(1): 78-85.

Petzke KJ, Elsner A, Proll J, Thielecke F et Metges CC (2000). "Long-term high protein intake does not increase oxidative stress in rats." J Nutr **130**(12): 2889-96.

Piga R, Naito Y, Kokura S, Handa O et Yoshikawa T (2007). "Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells." Atherosclerosis **193**(2): 328-34.

Pilvi TK, Jauhiainen T, Cheng ZJ, Mervaala EM, Vapaatalo H et Korpela R (2006). "Lupin protein attenuates the development of hypertension and normalises the vascular function of NaCl-loaded Goto-Kakizaki rats." J Physiol Pharmacol **57**(2): 167-76.

Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, Bayerle-Eder M, Roden M et Wolzt M (2002). "FFA-induced endothelial dysfunction can be corrected by vitamin C." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2913-7.

Plotnick GD, Corretti MC et Vogel RA (1997). "Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal." Jama **278**(20): 1682-6.
Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA, Hesslink R, Jr. et Wise JA (2003). "Effect of supplemental phytonutrients on impairment of the flow-mediated brachial artery vasoactivity after a single high-fat meal." J Am Coll Cardiol **41**(10): 1744-9.
Poppitt SD, Keogh GF, Mulvey TB, Phillips A, McArdle BH, MacGibbon AK et Cooper GJ (2004). "Effect of moderate changes in dietary fatty acid profile on postprandial lipaemia, haemostatic and related CVD risk factors in healthy men." Eur J Clin Nutr **58**(5): 819-27.
Poppitt SD (2005). "Postprandial Lipaemia, Haemostasis, Inflammatory Response and other Emerging Risk Factors for Cardiovascular Disease: The Influence of Fatty Meals." Curr Nutr Food Sci **1**: 23-34.
Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M et Quyyumi AA (1999). "Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability." J Am Coll Cardiol **34**(2): 507-14.
Preli RB, Klein KP et Herrington DM (2002). "Vascular effects of dietary L-arginine supplementation." Atherosclerosis **162**(1): 1-15.
Quijano C, Castro L, Peluffo G, Valez V et Radi R (2007). "Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(6): H3404-14.
Quyyumi AA (2003). "Prognostic value of endothelial function." Am J Cardiol **91**(12A): 19H-24H.
Quyyumi AA et Ozkor M (2006). "Vasodilation by hyperpolarization: beyond NO." Hypertension **48**(6): 1023-5.
Rabelink TJ et Luscher TF (2006). "Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 267-71.
Raitakari OT, Lai N, Griffiths K, McCredie R, Sullivan D et Celermajer DS (2000). "Enhanced peripheral vasodilation in humans after a fatty meal." J Am Coll Cardiol **36**(2): 417-22.
Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M et Kelm M (2002a). "Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood." Circ Res **91**(6): 470-7.
Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiss C, Strauer BE, Feelisch M et Kelm M (2002b). "Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma." J Clin Invest **109**(9): 1241-8.
Rassaf T, Feelisch M et Kelm M (2004). "Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues." Free Radic Biol Med **36**(4): 413-22.
Rassaf T, Heiss C, Hendgen-Cotta U, Balzer J, Matern S, Kleinbongard P, Lee A, Lauer T et Kelm M (2006). "Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation." Free Radic Biol Med **41**(2): 295-301.
Ray KK, Cannon CP et Ganz P (2006). "Beyond lipid lowering: What have we learned about the benefits of statins from the acute coronary syndromes trials?" Am J Cardiol **98**(11A): 18P-25P.
Reed AS, Charkoudian N, Vella A, Shah P, Rizza RA et Joyner MJ (2004). "Forearm vascular control during acute hyperglycemia in healthy humans." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(3): E472-80.
Remesy C, Morand C, Demigne C et Fafournoux P (1988). "Control of hepatic utilization of glutamine by transport processes or cellular metabolism in rats fed a high protein diet." J Nutr **118**(5): 569-78.
Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE et Cook NR (2002). "Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events." N Engl J Med **347**(20): 1557-65.
Ridker PM, Wilson PW et Grundy SM (2004). "Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk?" Circulation **109**(23): 2818-25.
Ridker PM (2007). "C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus." J Am Coll Cardiol **49**(21): 2129-38.
Roberfroid MB (1999). "What is beneficial for health? The concept of functional food." Food Chem Toxicol **37**(9-10): 1039-41.
Roberfroid MB (2000). "Concepts and strategy of functional food science: the European perspective." Am J Clin Nutr **71**(6 Suppl): 1660S-4S; discussion 1674S-5S.
Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A et Vaziri ND (2005). "A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression." J Appl Physiol **98**(1): 203-10.
Robin S, Courderot-Masuyer C, Nicod L, Jacqueson A, Richert L et Berthelot A (2004). "Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats." J Nutr Biochem **15**(2): 80-9.
Roche CJ, Dantsker D, Samuni U et Friedman JM (2006). "Nitrite reductase activity of sol-gel-encapsulated deoxyhemoglobin. Influence of quaternary and tertiary structure." J Biol Chem **281**(48): 36874-82.

Roche HM (1999). "Dietary carbohydrates and triacylglycerol metabolism." Proc Nutr Soc **58**(1): 201-7.
Ross R (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, Lozano A, Gomez P, Jimenez Y et Perez Jimenez F (2005). "Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients." J Am Coll Cardiol **46**(10): 1864-8.
Rubin D, Helwig U, Nothnagel M, Lemke N, Schreiber S, Folsch UR, Doring F et Schrezenmeir J (2008). "Postprandial plasma adiponectin decreases after glucose and high fat meal and is independently associated with postprandial triacylglycerols but not with -- 11388 promoter polymorphism." Br J Nutr **99**(1): 76-82.
Rueda-Clausen CF, Silva FA, Lindarte MA, Villa-Roel C, Gomez E, Gutierrez R, Cure-Cure C et Lopez-Jaramillo P (2007). "Olive, soybean and palm oils intake have a similar acute detrimental effect over the endothelial function in healthy young subjects." Nutr Metab Cardiovasc Dis **17**(1): 50-7.
Sampson MJ, Davies IR, Brown JC, Ivory K et Hughes DA (2002). "Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(7): 1187-93.
Sanders TA, Oakley FR, Cooper JA et Miller GJ (2001). "Influence of a stearic acid-rich structured triacylglycerol on postprandial lipemia, factor VII concentrations, and fibrinolytic activity in healthy subjects." Am J Clin Nutr **73**(4): 715-21.
Sattar N (2004). "Inflammation and endothelial dysfunction: intimate companions in the pathogenesis of vascular disease?" Clin Sci (Lond) **106**(5): 443-5.
Schachinger V, Britten MB et Zeiher AM (2000). "Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease." Circulation **101**(16): 1899-906.
Schafer FQ et Buettner GR (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radic Biol Med **30**(11): 1191-212.
Schillaci G, Marchesi S, Siepi D, Lupattelli G, Vaudo G, Pasqualini L et Mannarino E (2001). "Gender differences in postprandial endothelial function." Am J Cardiol **87**(11): 1323-5.
Schinkovitz A, Dittrich P et Wascher TC (2001). "Effects of a high-fat meal on resistance vessel reactivity and on indicators of oxidative stress in healthy volunteers." Clin Physiol **21**(4): 404-10.
Schmidt TS et Alp NJ (2007). "Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease." Clin Sci (Lond) **113**(2): 47-63.
Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, Ernst KV, Kelemen MD, Townsend SN, Capriotti A, Hare JM et Gerstenblith G (2006). "L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial." Jama **295**(1): 58-64.
Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M et Balligand JL (2005). "Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis." Pharmacol Ther **108**(3): 225-56.
Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F et Boger RH (2008). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism." Br J Clin Pharmacol **65**(1): 51-9.
Selhub J (1999). "Homocysteine metabolism." Annu Rev Nutr **19**: 217-46.
Selhub J (2006). "The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts." J Nutr **136**(6 Suppl): 1726S-1730S.
Shaul PW (2003). "Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis." J Physiol **547**(Pt 1): 21-33.
Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H et Flier JS (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." J Clin Invest **116**(11): 3015-25.
Shi W, Wang X, Shih DM, Laubach VE, Navab M et Lusis AJ (2002). "Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase." Circulation **105**(17): 2078-82.
Shimabukuro M, Chinen I, Higa N, Takasu N, Yamakawa K et Ueda S (2007). "Effects of dietary composition on postprandial endothelial function and adiponectin concentrations in healthy humans: a crossover controlled study." Am J Clin Nutr **86**(4): 923-8.
Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, Gokce N, Keaney JF, Jr., Penn MS, Sprecher DL, Vita JA et Hazen SL (2003). "Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy." Jama **289**(13): 1675-80.
Si H et Liu D (2008). "Genistein, a soy phytoestrogen, upregulates the expression of human endothelial nitric oxide synthase and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats." J Nutr **138**(2): 297-304.
Siafarikas A, Watts K, Beye P, Jones TW, Davis EA et Green DJ (2004). "Lack of effect of oral glucose loading on conduit vessel endothelial function in healthy subjects." Clin Sci (Lond) **107**(2): 191-6.
Siasos G, Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadi E et Stefanadis C (2007). "L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis?" Int J Cardiol **116**(3): 300-8.

Sies H, Stahl W et Sevanian A (2005). "Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress." J Nutr **135**(5): 969-72.
Signori LU, Vargas da Silva AM, Della Mea Plentz R, Geloneze B, Moreno H, Jr., Bello-Klein A, Irigoyen MC et D'Agord Schaan B (2008). "Reduced venous endothelial responsiveness after oral lipid overload in healthy volunteers." Metabolism **57**(1): 103-9.
Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB et Willett WC (2000). "Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle." N Engl J Med **343**(1): 16-22.
Steinberg FM, Guthrie NL, Villablanca AC, Kumar K et Murray MJ (2003). "Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women." Am J Clin Nutr **78**(1): 123-30.
Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B et Baron AD (1997). "Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation." J Clin Invest **100**(5): 1230-9.
Stipanuk MH (2004). "SULFUR AMINO ACID METABOLISM: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine." Annu Rev Nutr **24**: 539-77.
Strey CH, Young J, Collier M, Florkowski CM, Shand BI et Scott RS (2004). "The postprandial state does not impair endothelial function in women with type 2 diabetes irrespective of glycaemic control." Diabetologia **47**(10): 1838-46.
Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF et Cooke JP (2001). "Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine." Circulation **104**(21): 2569-75.
Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O et Cooke JP (2003). "Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine." Circulation **108**(8): 933-8.
Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y et Ogawa Y (2007). "Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(1): 84-91.
Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr. et Lerman A (2000). "Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction." Circulation **101**(9): 948-54.
Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ et Verma S (2003a). "New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I." Circulation **108**(16): 1917-23.
Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ et Verma S (2003b). "Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II." Circulation **108**(17): 2041-8.
Takase B, Hamabe A, Satomura K, Akima T, Uehata A, Ohsuzu F, Ishihara M et Kurita A (2005). "Close relationship between the vasodilator response to acetylcholine in the brachial and coronary artery in suspected coronary artery disease." Int J Cardiol **105**(1): 58-66.
Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon KM, Yokoyama M et Kawashima S (2007). "A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1632-7.
The-DECODE-study-group (1999). "Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetic Association diagnostic criteria." The Lancet **354**(9179): 617-621.
Tholstrup T, Miller GJ, Bysted A et Sandstrom B (2003). "Effect of individual dietary fatty acids on postprandial activation of blood coagulation factor VII and fibrinolysis in healthy young men." Am J Clin Nutr **77**(5): 1125-32.
Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD et Wink DA (2008). "The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling." Free Radic Biol Med **45**(1): 18-31.
Thomas SR, Chen K et Keaney JF, Jr. (2003). "Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity." Antioxid Redox Signal **5**(2): 181-94.
Ting HJ, Stice JP, Schaff UY, Hui DY, Rutledge JC, Knowlton AA, Passerini AG et Simon SI (2007). "Triglyceride-rich lipoproteins prime aortic endothelium for an enhanced inflammatory response to tumor necrosis factor-alpha." Circ Res **100**(3): 381-90.
Title LM, Cummings PM, Giddens K et Nassar BA (2000). "Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E." J Am Coll Cardiol **36**(7): 2185-91.
Toborek M et Kaiser S (1999). "Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis." Basic Res Cardiol **94**(5): 295-314.
Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH et Stampfer M (2004). "Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke,

myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial." Jama **291**(5): 565-75.
Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L et Hanson MA (2003). "Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring." J Physiol **547**(Pt 1): 77-84.
Torres N, Torre-Villalvazo I et Tovar AR (2006). "Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders." J Nutr Biochem **17**(6): 365-73.
Townsend DM, Tew KD et Tapiero H (2003). "The importance of glutathione in human disease." Biomed Pharmacother **57**(3-4): 145-55.
Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A et Dandona P (2003). "Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects." Diabetes **52**(12): 2882-7.
Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH et Selhub J (2003). "The atherogenic effect of excess methionine intake." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15089-94.
Tsai WC, Li YH, Lin CC, Chao TH et Chen JH (2004). "Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal." Clin Sci (Lond) **106**(3): 315-9.
Tsikas D et Caidahl K (2005). "Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein-associated 3-nitrotyrosine in human plasma." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **814**(1): 1-9.
Tushuizen ME, Nieuwland R, Scheffer PG, Sturk A, Heine RJ et Diamant M (2006). "Two consecutive high-fat meals affect endothelial-dependent vasodilation, oxidative stress and cellular microparticles in healthy men." J Thromb Haemost **4**(5): 1003-10.
Tyldum GA, Schjerve IE, Tjonna AE, Kirkeby-Garstad I, Stolen TO, Richardson RS et Wisloff U (2009). "Endothelial dysfunction induced by post-prandial lipemia: complete protection afforded by high-intensity aerobic interval exercise." J Am Coll Cardiol **53**(2): 200-6.
Vallance P (2001). "Comment: the asymmetrical dimethylarginine/dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway in the regulation of nitric oxide generation." Clin Sci (Lond) **100**(2): 159-60.
Vallance P et Leiper J (2004). "Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1023-30.
van Eijk HM, Luiking YC et Deutz NE (2007). "Methods using stable isotopes to measure nitric oxide (NO) synthesis in the L-arginine/NO pathway in health and disease." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **851**(1-2): 172-85.
Van Gaal LF, Mertens IL et De Block CE (2006). "Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease." Nature **444**(7121): 875-80.
Van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Rabelink TJ, Van Asbeck BS et Cabezas MC (2003a). "Postprandial leukocyte increase in healthy subjects." Metabolism **52**(2): 199-202.
van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Koning EJ, Rabelink TJ et Castro Cabezas M (2003b). "Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction." J Lipid Res **44**(3): 576-83.
van Oostrom AJ, van Dijk H, Verseyden C, Sniderman AD, Cianflone K, Rabelink TJ et Castro Cabezas M (2004). "Addition of glucose to an oral fat load reduces postprandial free fatty acids and prevents the postprandial increase in complement component 3." Am J Clin Nutr **79**(3): 510-5.
Vega-Lopez S et Lichtenstein AH (2005). "Dietary protein type and cardiovascular disease risk factors." Prev Cardiol **8**(1): 31-40.
Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA et Stewart DJ (2002). "A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis." Circulation **106**(8): 913-9.
Vigna GB, Delli Gatti C et Fellin R (2004). "Endothelial function and postprandial lipemia." Nutr Metab Cardiovasc Dis **14**(3): 121-7.
Vogel RA, Corretti MC et Plotnick GD (1997). "Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects." Am J Cardiol **79**(3): 350-4.
Vogel RA, Corretti MC et Plotnick GD (2000). "The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function." J Am Coll Cardiol **36**(5): 1455-60.
Wald DS, Law M et Morris JK (2002). "Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis." Bmj **325**(7374): 1202.
Wald DS, Wald NJ, Morris JK et Law M (2006). "Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence." Bmj **333**(7578): 1114-7.
Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B et Teerlink T (2003). "Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading." Scand J Clin Lab Invest **63**(5): 347-53.

Wang BY, Singer AH, Tsao PS, Drexler H, Kosek J et Cooke JP (1994). "Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit." J Am Coll Cardiol **23**(2): 452-8.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T et Munzel T (1999). "Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system." Circulation **99**(15): 2027-33.

Weber C, Zernecke A et Libby P (2008). "The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models." Nat Rev Immunol **8**(10): 802-15.

Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C et Loscalzo J (2001). "Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12503-8.

West SG, Hecker KD, Mustad VA, Nicholson S, Schoemer SL, Wagner P, Hinderliter AL, Ulbrecht J, Ruey P et Kris-Etherton PM (2005). "Acute effects of monounsaturated fatty acids with and without omega-3 fatty acids on vascular reactivity in individuals with type 2 diabetes." Diabetologia **48**(1): 113-22.

Westphal S, Taneva E, Kastner S, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger S, Kropf S, Dierkes J et Luley C (2006). "Endothelial dysfunction induced by postprandial lipemia is neutralized by addition of proteins to the fatty meal." Atherosclerosis **185**(2): 313-9.

White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM et Freeman BA (1996). "Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8745-9.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr. et Vita JA (2003). "The clinical implications of endothelial dysfunction." J Am Coll Cardiol **42**(7): 1149-60.

Williams CM (1997). "Postprandial lipid metabolism: effects of dietary fatty acids." Proceedings of the Nutrition Society **56**(02): 679-692.

Williams CM, Maitin V et Jackson KG (2004). "Triacylglycerol-rich lipoprotein-gene interactions in endothelial cells." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 994-8.

Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, de Jong SA, Walker RJ et Wilkins GT (1999). "Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat." J Am Coll Cardiol **33**(4): 1050-5.

Williams MJ, Sutherland WH, McCormick MP, Yeoman D, de Jong SA et Walker RJ (2001). "Normal endothelial function after meals rich in olive or safflower oil previously used for deep frying." Nutr Metab Cardiovasc Dis **11**(3): 147-52.

Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC et Creager MA (1998). "Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo." Circulation **97**(17): 1695-701.

Wilmink HW, Banga JD, Hijmering M, Erkelens WD, Stroes ES et Rabelink TJ (1999). "Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on postprandial endothelial function." J Am Coll Cardiol **34**(1): 140-5.

Witte DR, Westerink J, de Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE et Bots ML (2005). "Is the association between flow-mediated dilation and cardiovascular risk limited to low-risk populations?" J Am Coll Cardiol **45**(12): 1987-93.

Witte MB et Barbul A (2002). "Role of nitric oxide in wound repair." Am J Surg **183**(4): 406-12.

Wolever TM, Chiasson JL, Csima A, Hunt JA, Palmason C, Ross SA et Ryan EA (1998). "Variation of postprandial plasma glucose, palatability, and symptoms associated with a standardized mixed test meal versus 75 g oral glucose." Diabetes Care **21**(3): 336-40.

Woodman RJ et Watts GF (2003). "Measurement and application of arterial stiffness in clinical research: focus on new methodologies and diabetes mellitus." Med Sci Monit **9**(5): RA81-9.

Worthylake RA et Burridge K (2001). "Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 569-77.

Wu G et Meininger CJ (1993). "Regulation of L-arginine synthesis from L-citrulline by L-glutamine in endothelial cells." Am J Physiol **265**(6 Pt 2): H1965-71.

Wu G et Morris SM, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J **336 (Pt 1)**: 1-17.

Xia Z, Nagareddy PR, Guo Z, Zhang W et McNeill JH (2006). "Antioxidant N-acetylcysteine restores systemic nitric oxide availability and corrects depressions in arterial blood pressure and heart rate in diabetic rats." Free Radic Res **40**(2): 175-84.

Xiao CW (2008). "Health effects of soy protein and isoflavones in humans." J Nutr **138**(6): 1244S-9S.

Yap S, Boers GH, Wilcken B, Wilcken DE, Brenton DP, Lee PJ, Walter JH, Howard PM et Naughten ER (2001). "Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(12): 2080-5.

Yetik-Anacak G et Catravas JD (2006). "Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease." Vascul Pharmacol **45**(5): 268-76.
Zaidi N, Maurer A, Nieke S et Kalbacher H (2008). "Cathepsin D: a cellular roadmap." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 5-9.
Zeymer U, Schwarzmaier-D'assie A, Petzinna D et Chiasson JL (2004). "Effect of acarbose treatment on the risk of silent myocardial infarctions in patients with impaired glucose tolerance: results of the randomised STOP-NIDDM trial electrocardiography substudy." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **11**(5): 412-5.
Zhang C (2008). "The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction." Basic Res Cardiol **103**(5): 398-406.
Zhang R, Ma J, Xia M, Zhu H et Ling W (2004). "Mild hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in methionine or deficient in folate promotes early atherosclerotic inflammatory processes." J Nutr **134**(4): 825-30.
Zhang Y et Hogg N (2005). "S-Nitrosothiols: cellular formation and transport." Free Radic Biol Med **38**(7): 831-8.
Zilversmit DB (1979). "Atherogenesis: a postprandial phenomenon." Circulation **60**(3): 473-85.
Zylberstein DE, Bengtsson C, Bjorkelund C, Landaas S, Sundh V, Thelle D et Lissner L (2004). "Serum homocysteine in relation to mortality and morbidity from coronary heart disease: a 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg." Circulation **109**(5): 601-6.

468 références

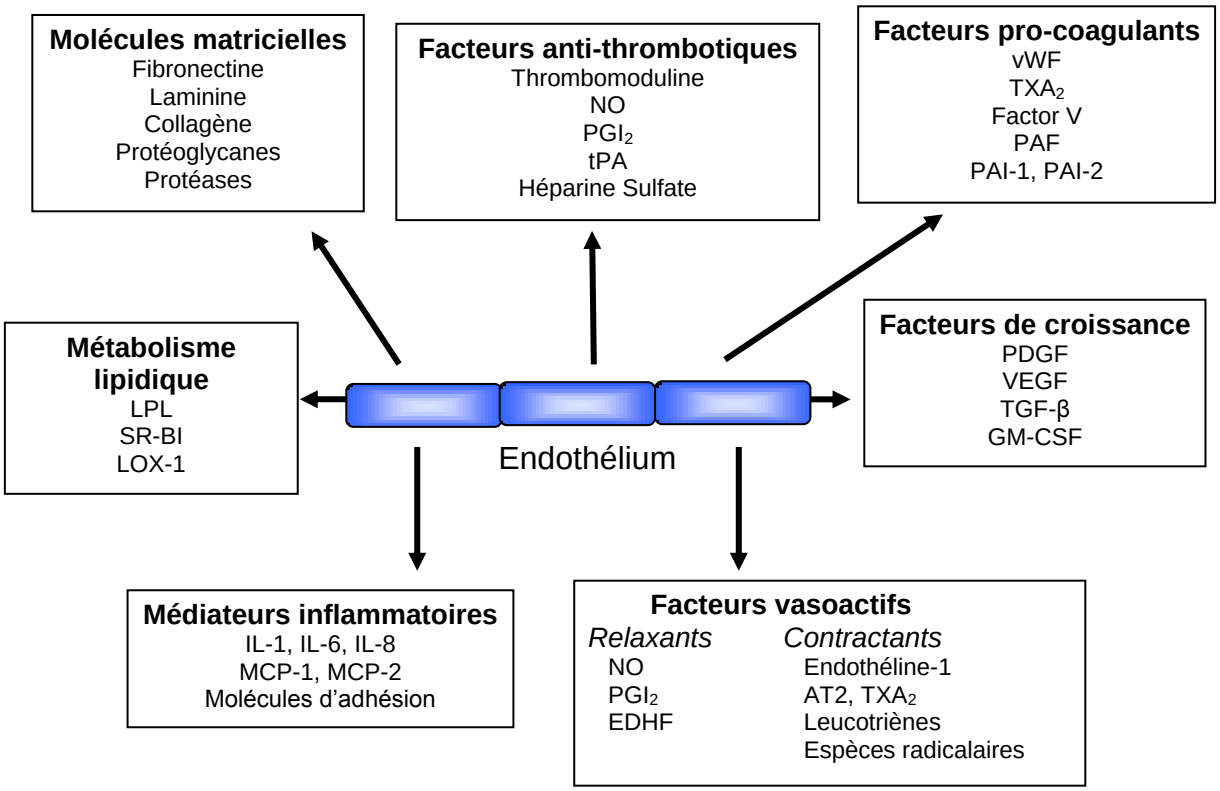


Figure 1 : Médiateurs synthétisés et sécrétés par l'endothélium vasculaire.

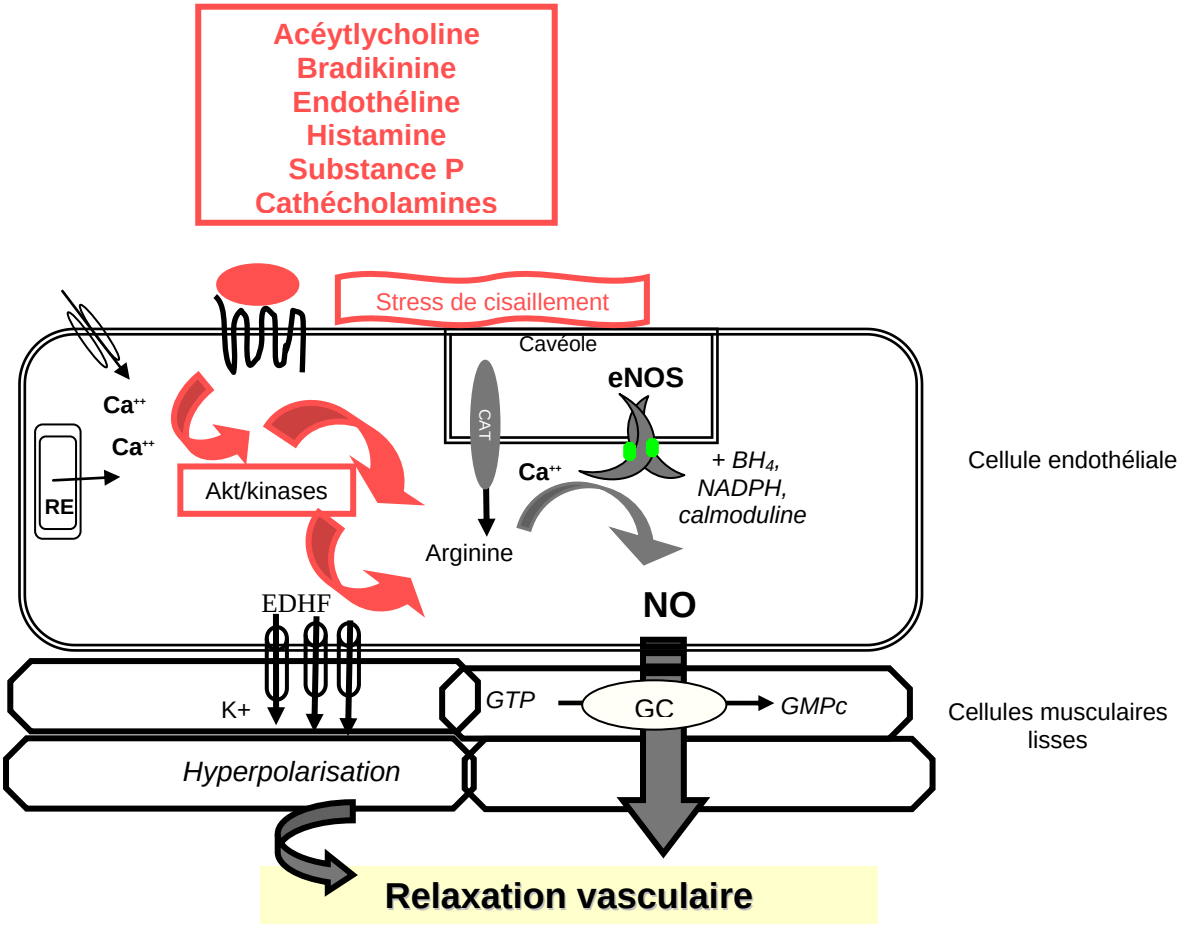


Figure 2 : Stimulations physique ou chimiques de l'endothélium vasculaire

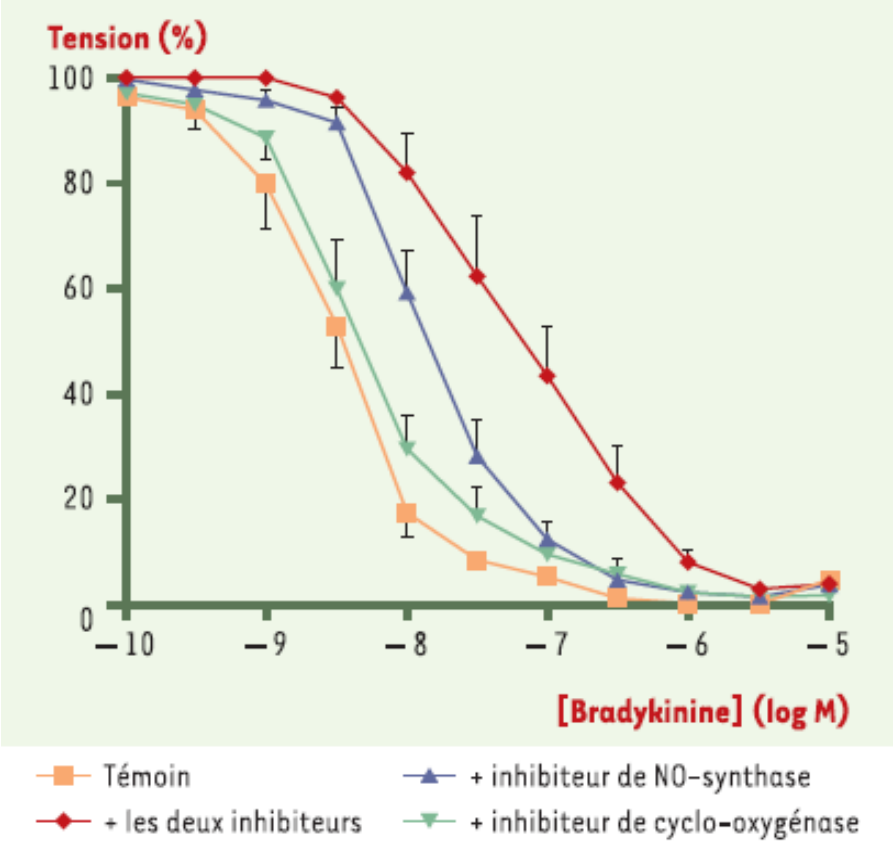


Figure 3 : Courbe d'inhibition de la relaxation vasculaire en réponse à la bradykinine sur des anneaux d'artères coronaires isolés de chien.
La relaxation dépendante de l'endothélium induite par l'administration de bradykinine, est partiellement inhibée par la présence conjointe d'indométacine (inhibiteur de cyclo-oxygénase) et de L-NAME (inhibiteur de NO-synthase). La composante de la relaxation qui subsiste en présence de ces deux inhibiteurs est attribuée à un mécanisme d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses, EDHF.
D'après Feletou et al. 2003

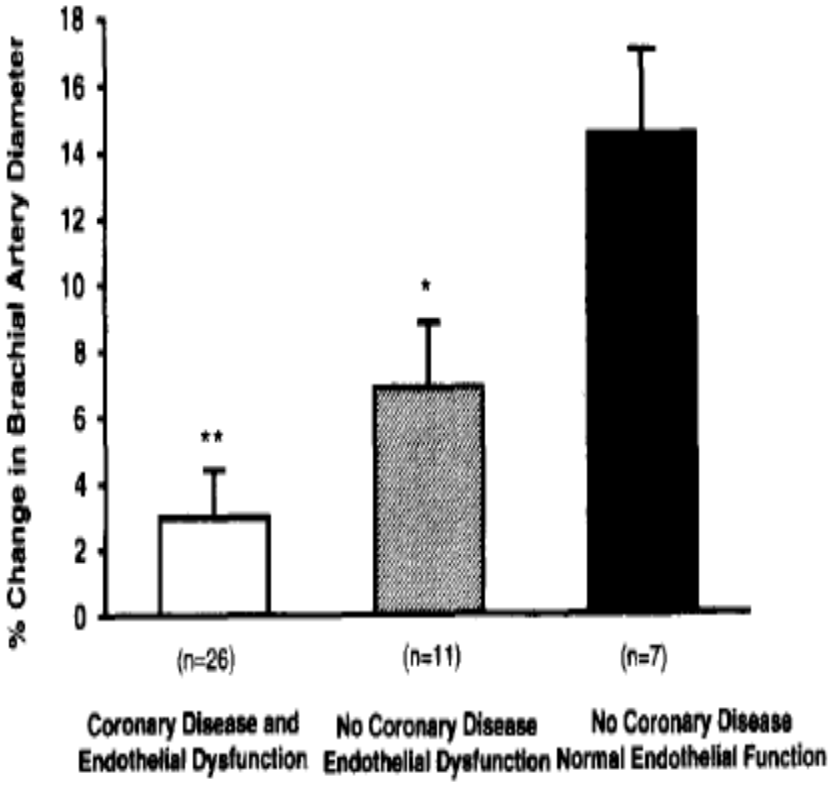


Figure 4 : Evaluation de la dysfonction endothéliale au niveau de l'artère brachiale à différents stades du développement des maladies pathologies coronaires
Une altération significative de la vasodilatation de l'artère brachiale mesurée en réponse à un stress de cisaillement est observée non seulement chez des sujets atteints de maladies coronariennes mais aussi chez des sujets asymptomatiques manifestant une dysfonction endothéliale au niveau de la circulation coronarienne par rapport à des sujets sains. Cette étude est la première à suggérer l'utilisation clinique de l'exploration non-invasive de la fonction endothéliale au niveau de l'artère brachiale.
D'après Anderson et al. 1995

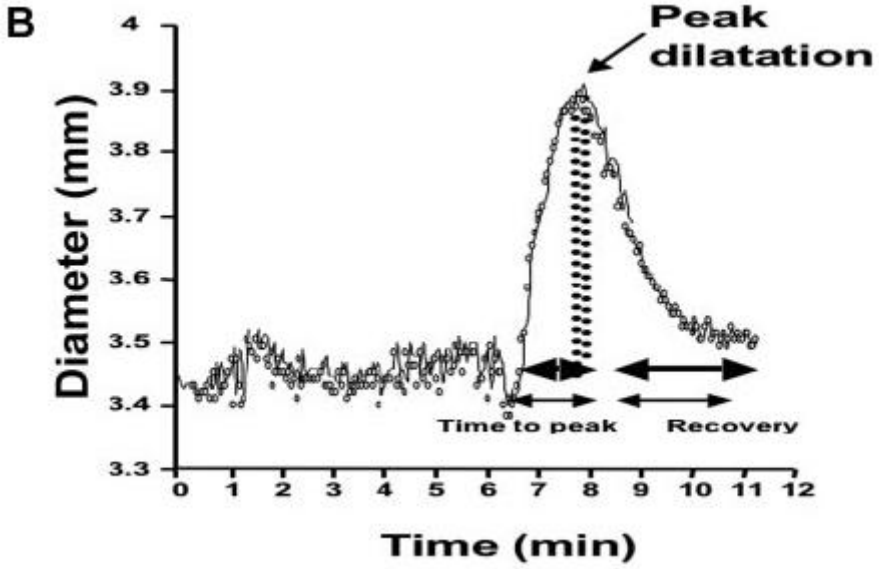


Figure 5 : Sonde utilisée pour la mesure de la FMD (A) et signal de FMD (B)
Le ballonnet d'occlusion d'un sphygmomanomètre placé au niveau distale de l'artère brachiale est rapidement gonflé à 200mmHg puis progressivement dégonflé. La mesure en continue (toute les 3 secondes) du diamètre de l'artère brachiale est réalisée à l'aide d'une sonde ultrason, avant, pendant et après le gonflement et le dégonflement du ballonnet d'occlusion. La FMD ou vasodilatation dépendante du flux sanguin est souvent exprimée en variation maximale du diamètre de l'artère brachiale.
D'après Deanfield et al. 2007

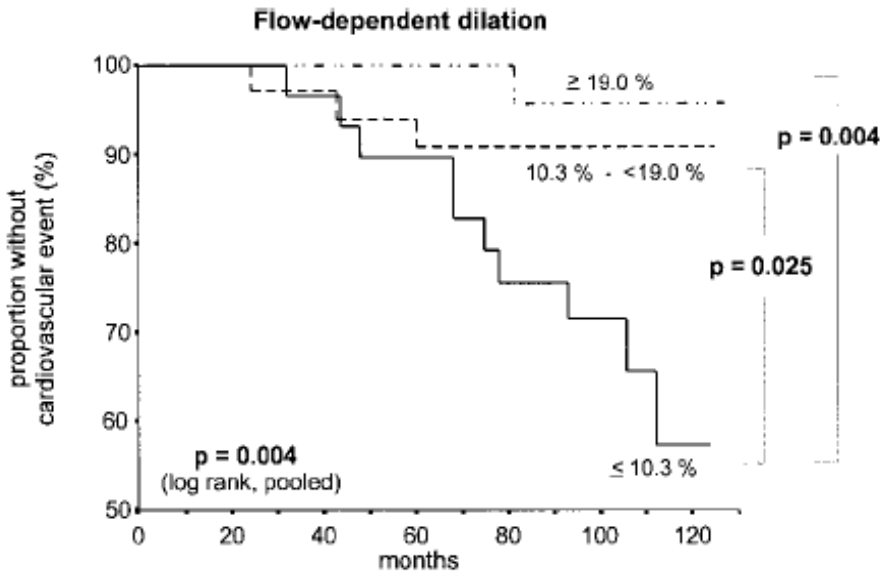


Figure 6 : Valeur pronostique de la mesure de la FMD pour la prédiction de la survenue d'accidents vasculaires coronariens
Courbe de survie Kaplan-Meier réalisée sur 147 sujets suivis pendant 7,7 ans, montrant le lien étroit entre l'altération de la FMD divisée en tertile et la survenue d'évènements cardiovasculaires
D'après Shachinger et al. 2000.

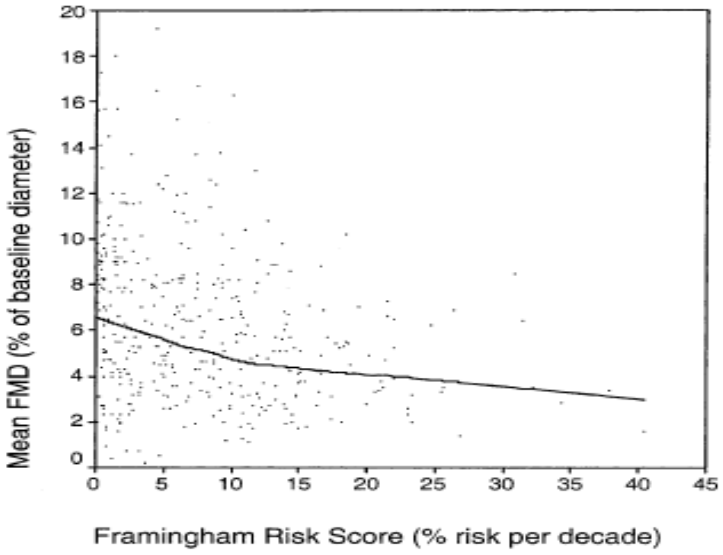


Figure 7 : Evaluation du la FMD en fonction du niveau de risque cardiovasculaire selon l'équation de Framingham
Méta-analyse à partir de 211 articles (399 sujets) montrant une altération significative de la FMD observée chez des sujets à faible risque cardiovasculaire (dont le score de Framingham est faible)
D'après Witte et al. 2005.

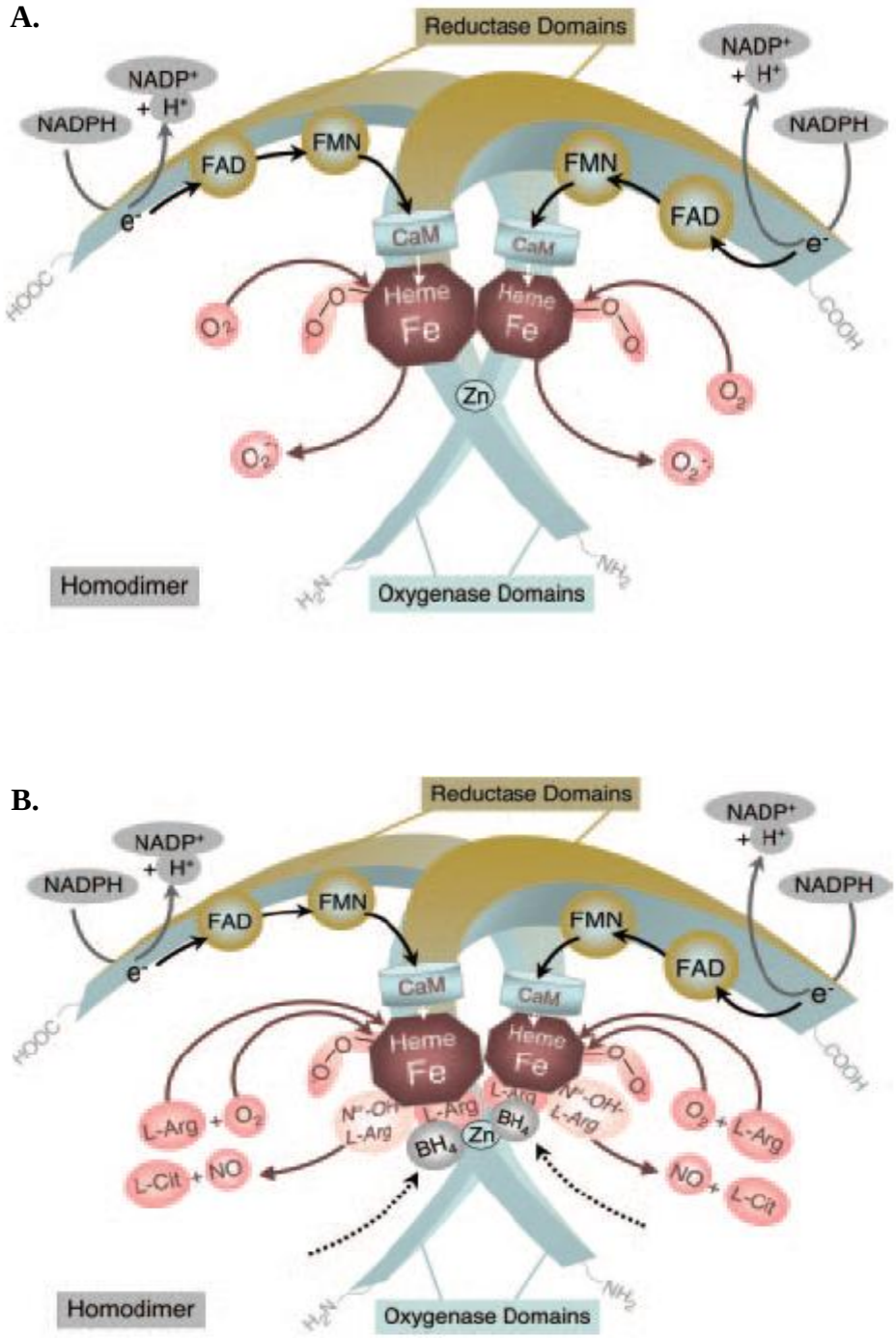


Figure 8 : Formes découplée (A) et couplée (B) de la NOS endothéliale
A. La présence de groupements hèmes permet le rapprochement des domaines réductase C-terminal et des domaines oxygénase N-Terminal de l'enzyme et favorise le transfert d'électrons à partir du NADPH via les cofacteurs flaviniques (FAD, FMN) et la réduction de l'oxygène en anions superoxyde : l'enzyme est sous sa forme découplée.
B. La présence du substrat L-Arginine et du cofacteur BH_4, en quantités suffisantes, favorise une réduction de façon couplée de l'oxygène et des groupements hèmes et permet ainsi la synthèse de NO et de L-citrulline : l'enzyme est sous sa forme couplée, active.
D'après Forstermann et Munzel 2006.

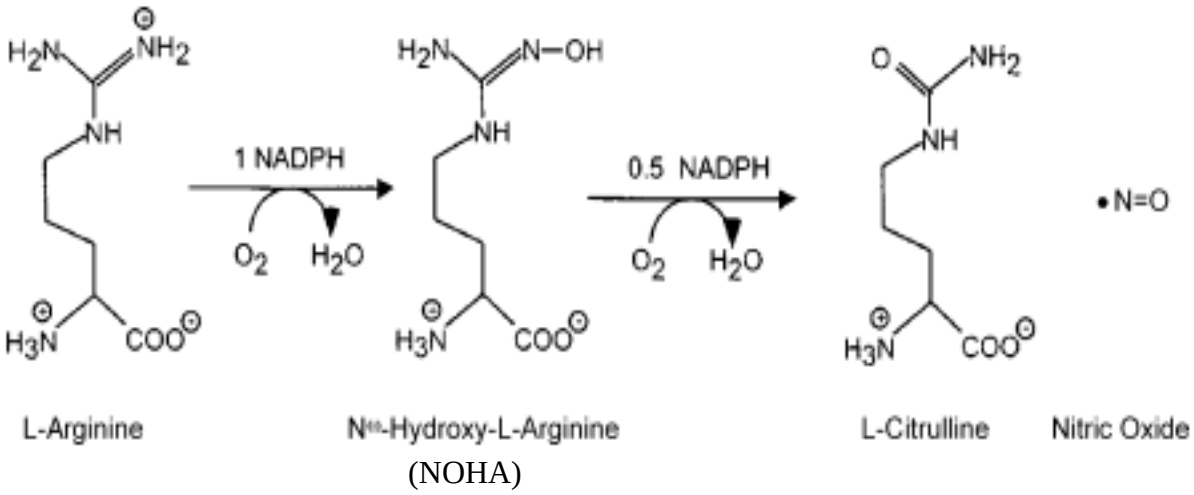


Figure 9 : Synthèse du NO à partir de la L-arginine
D'après Alderton et al. 2001

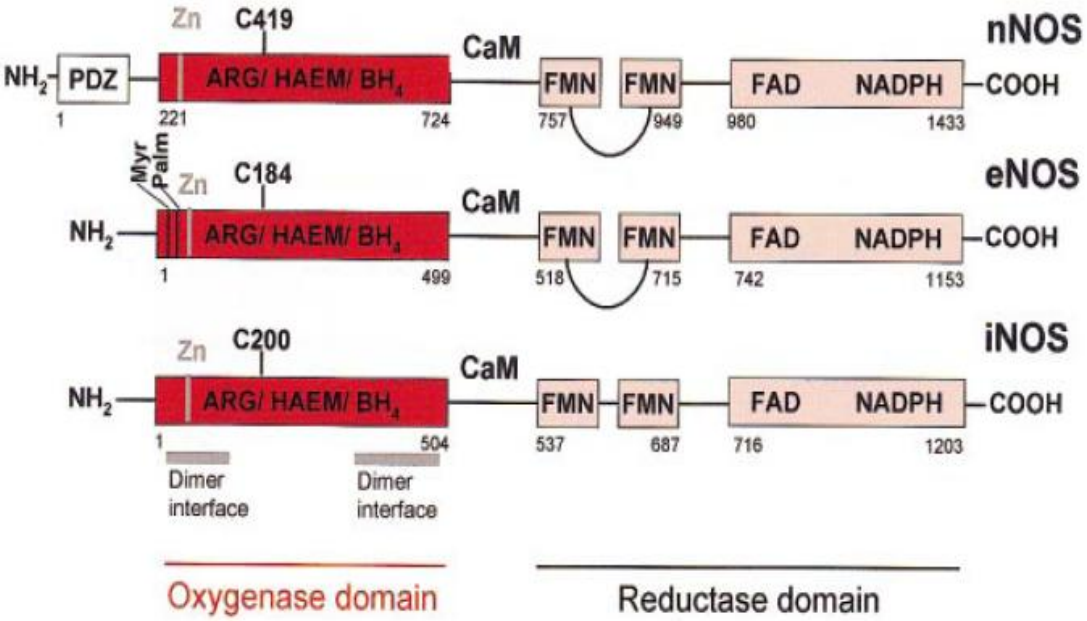


Figure 10 : Les trois isoformes de la NOS
Pour chaque isoforme, neuronale, endothéliale et inductible, les domaines oxygénase N-Terminal et réductase C-terminal sont représentés, ainsi que les numéros de résidus acides aminés, l'emplacement du résidu cystéine liant le groupement hème, les sites de palmitoylation (Palm), de myristoylation (Myr) et de fixation des différents cofacteurs.
D'après Alderton 2001

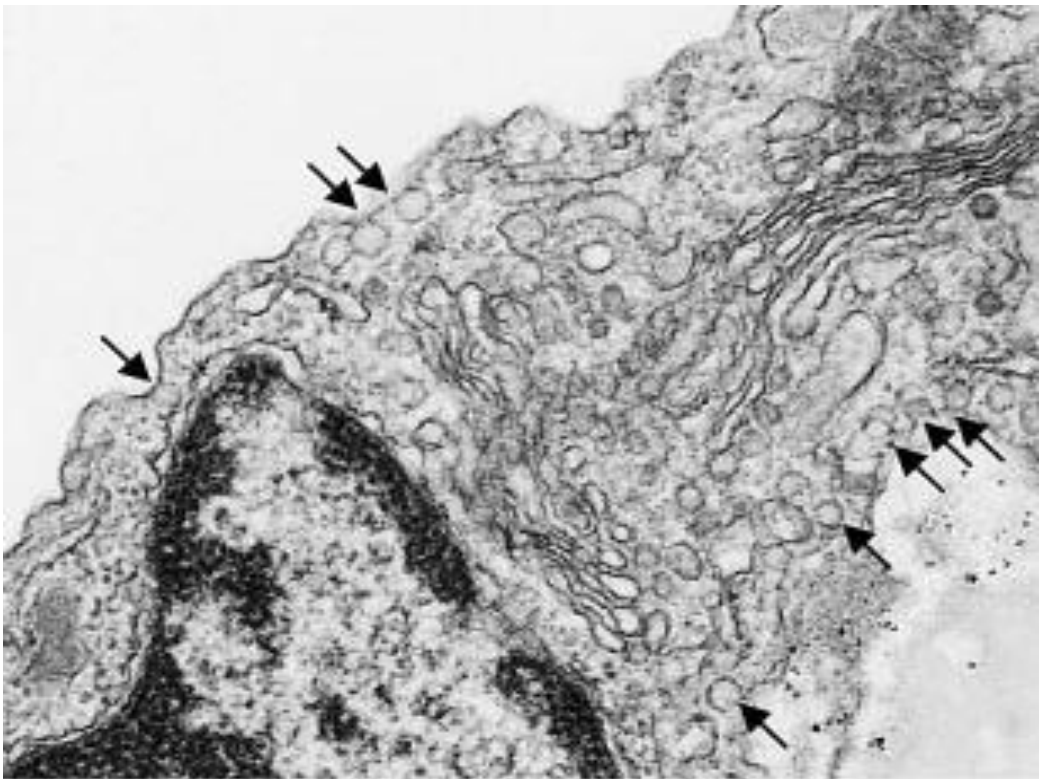


Figure 11 : Cavéoles en microscopie électronique
Les flèches indiquent les cavéoles ou micro-domaines membranaires à la surface d'une cellule endothéliale aortique (Grossissement x1.5)
D'après Frank et al. 2003

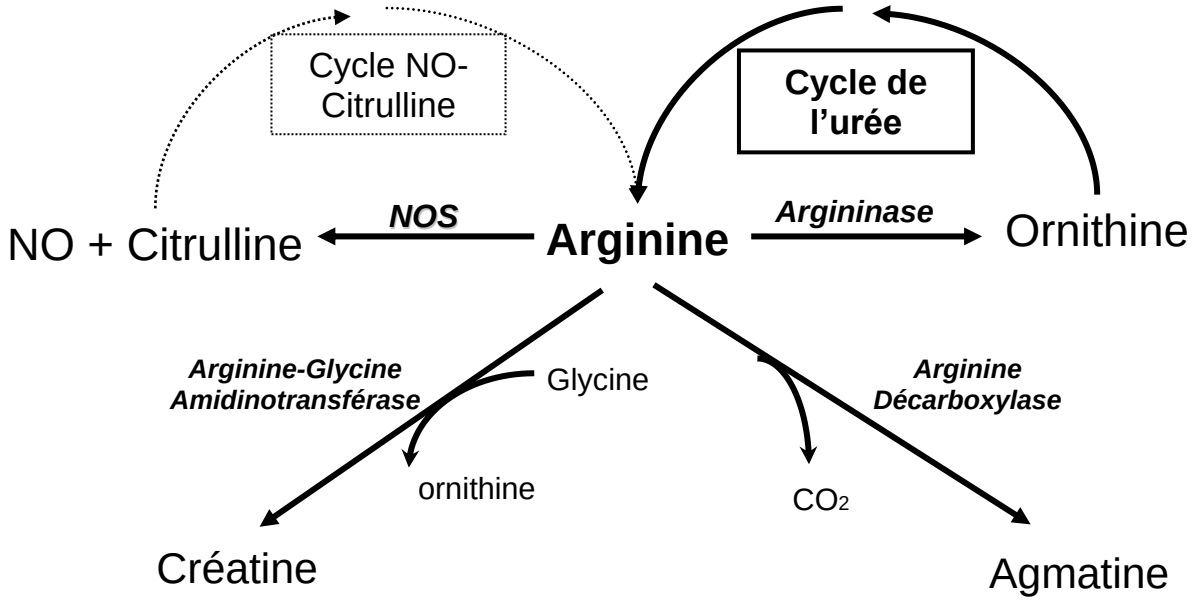


Figure 12 : Modulation de la biodisponibilité de l'arginine
D'après Morris 2002

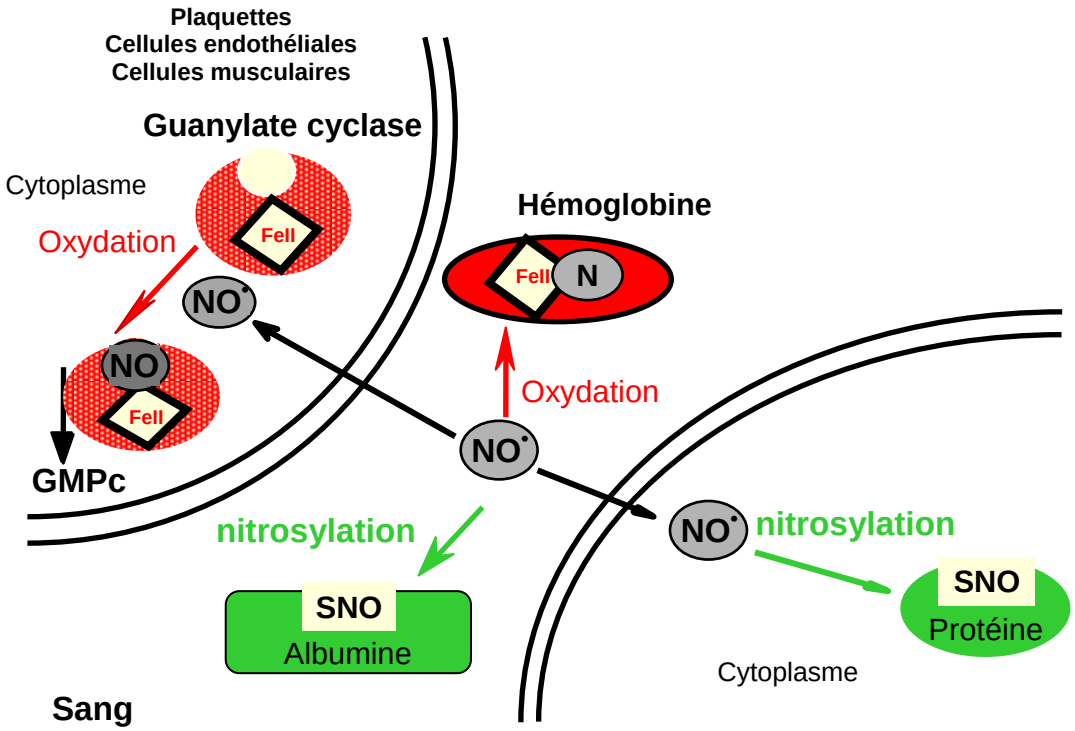


Figure 13 : Régulation de la biodisponibilité du NO au niveau systémique
D'après Dufhilo, 2006

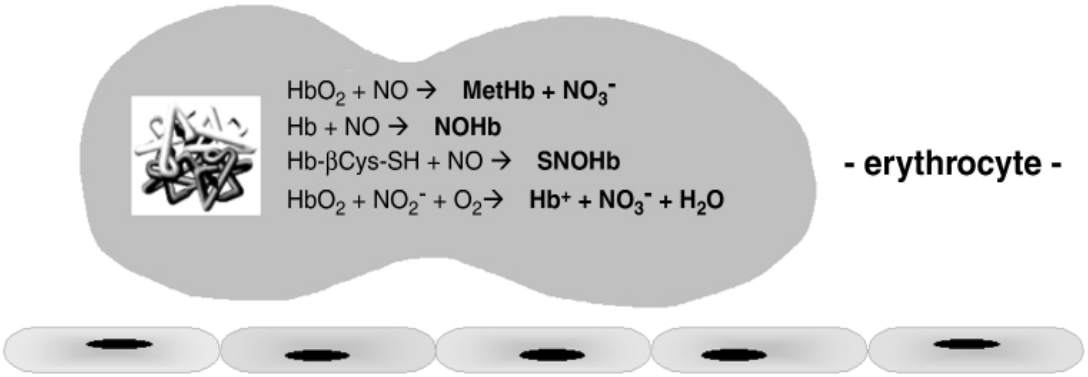


Figure 14 : Réactions impliquant le NO au niveau des érythrocytes
Le NO peut être oxydé soit par l'oxyhémoglobine (HbO_2) et conduit à la synthèse de methémoglobine (MetHb) et d'ions nitrates, soit par la deoxyhémoglobine et entraine la production de nitrosylhémoglobine (NOHb). L'interaction entre le NO et le résidu Cystéine 93 du groupement hème de l'hémoglobine entraine la synthèse de *S*-nitrosohémoglobine (SNOHb). Les ions nitrites (NO_2^-) plasmatiques peuvent être rapidement capturés par les érythrocytes et être oxydés en ions nitrates (NO_3^-) de façon hémoglobine-dépendante.
D'après Lauer et al. 2002

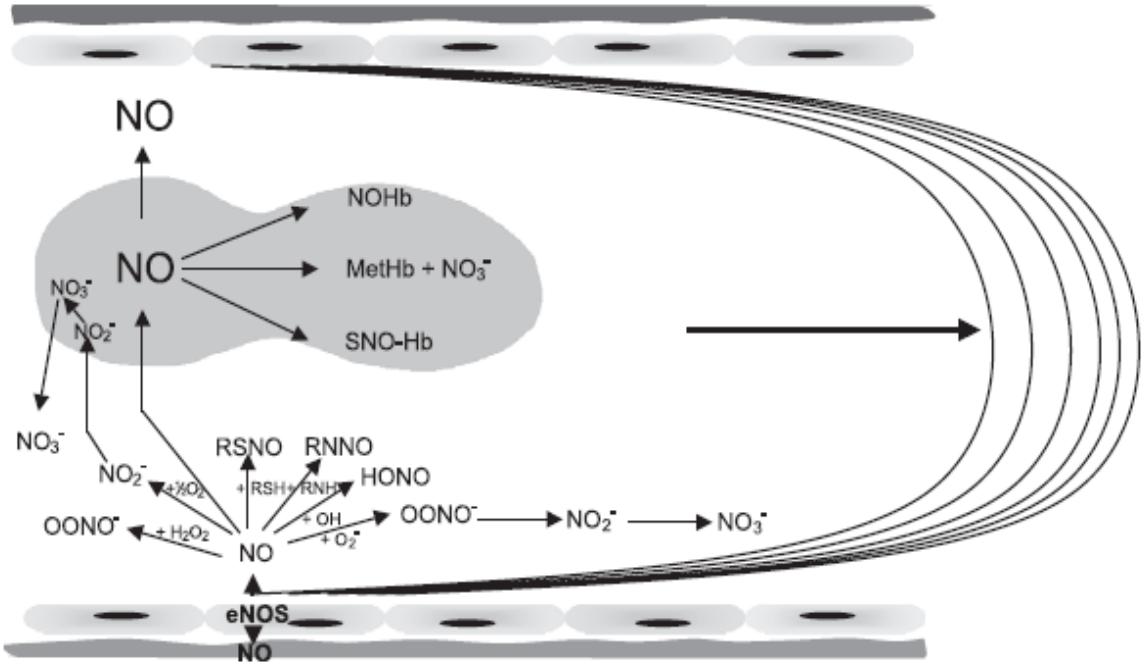


Figure 15 : Distribution du NO au niveau du plasma
Le NO plasmatique est principalement oxydé en ions nitrites (NO_2^-). Au niveau du plasma, le NO peut également réagir soit directement avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et former des peroxynitrites ($ONOO^-$), soit indirectement, avec des résidus thiols ou amines, formant ainsi des nitrosothiols (RSNO) et des nitrosamines (RNNO).
D'après Rassaf et al. 2004

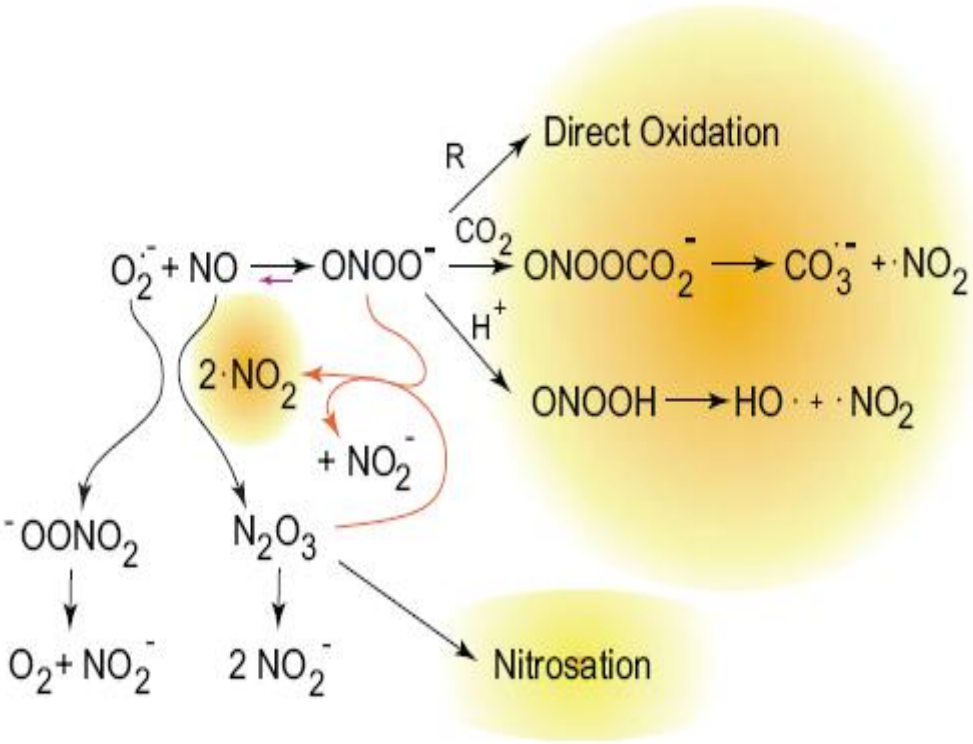


Figure 16 : Réactions impliquant les peroxynitrites
En présence de quantités importantes de NO et d'anions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), les peroxynitrites ($ONOO^-$) peuvent être décomposés en ions nitrites (NO_2^-) ou transformés en dioxyde d'azote (NO_2), radical très réactif, conduisant des réactions de nitrosation ou nitration.
D'après Pacher et al. 2007

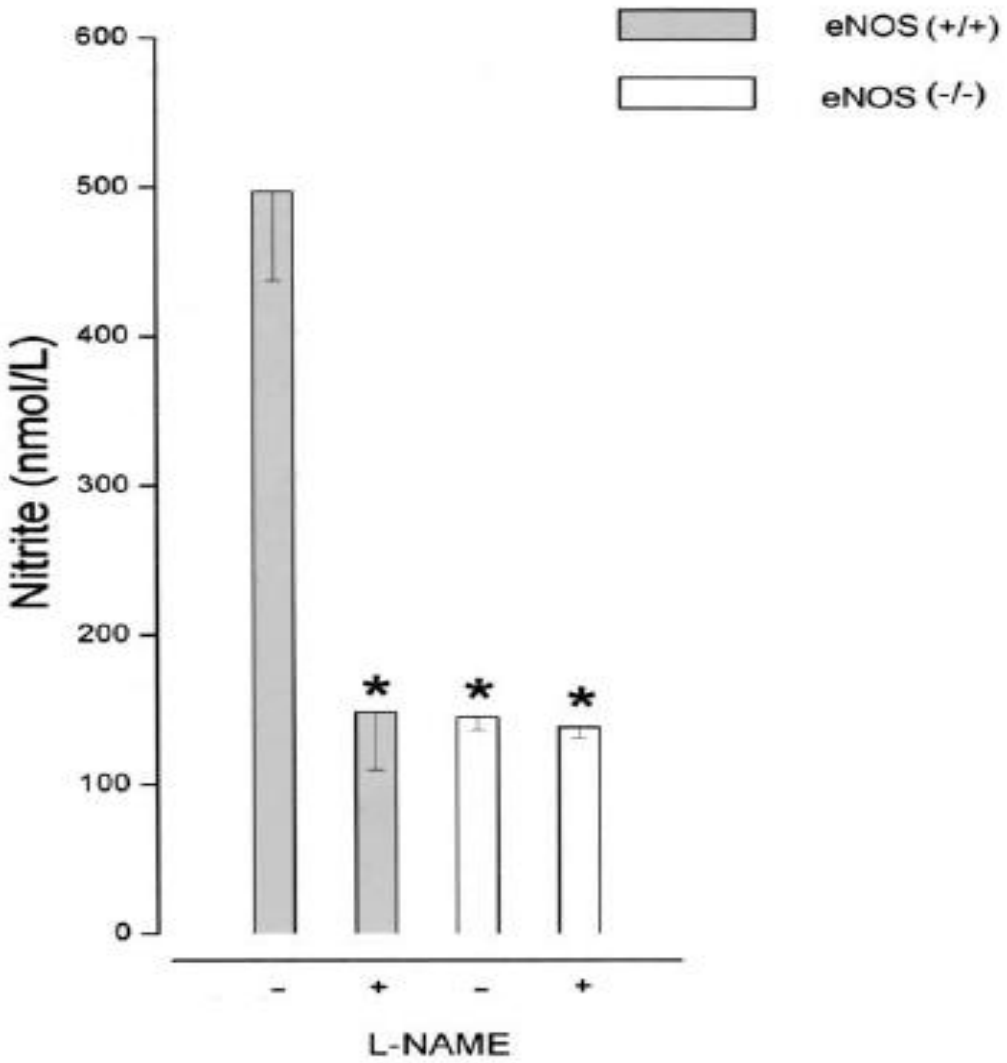


Figure 17 : Contribution de la NOS endothéliale à la formation de nitrites
L'application de 10mg/kg de L-NAME, inhibiteur de la NOS, pendant 5 jours, dans l'eau de boisson de souris sauvages eNOS+/+ (n=10 ; barres grisées), induit une réduction significative de 70% des nitrites plasmatiques. Chez les souris eNOS-/- (n=4 ; barres blanches), le niveau basal en nitrites plasmatiques est significativement plus faible par rapport à celui observé chez les souris sauvages et l'inhibition de l'activité NOS n'a aucun effet sur les concentrations plasmatiques en nitrites.
D'après Kleinbongard et al. 2003

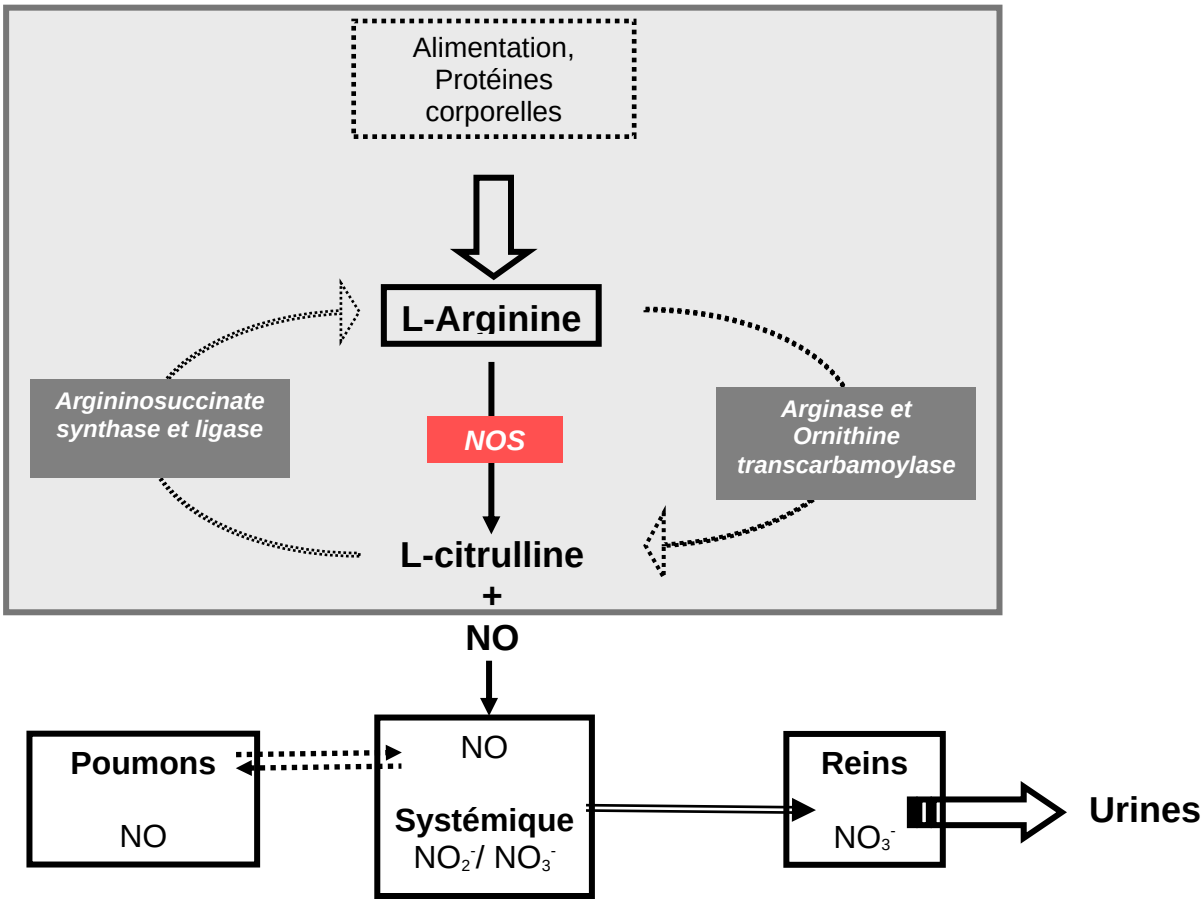


Figure 18 : Voie de synthèse et de dégradation du NO
L'arginine, substrat de la synthèse de NO, est principalement issu de la protéolyse. Une fraction de l'arginine est synthétisée de façon endogène à partir du cycle de l'urée et de la conversion de la citrulline. Après une conversion en nitrites/nitrates au niveau systémique, le NO produit, peut être expiré ou excrété sous forme de nitrates urinaires.
D'après Luiking et Deuz 2003

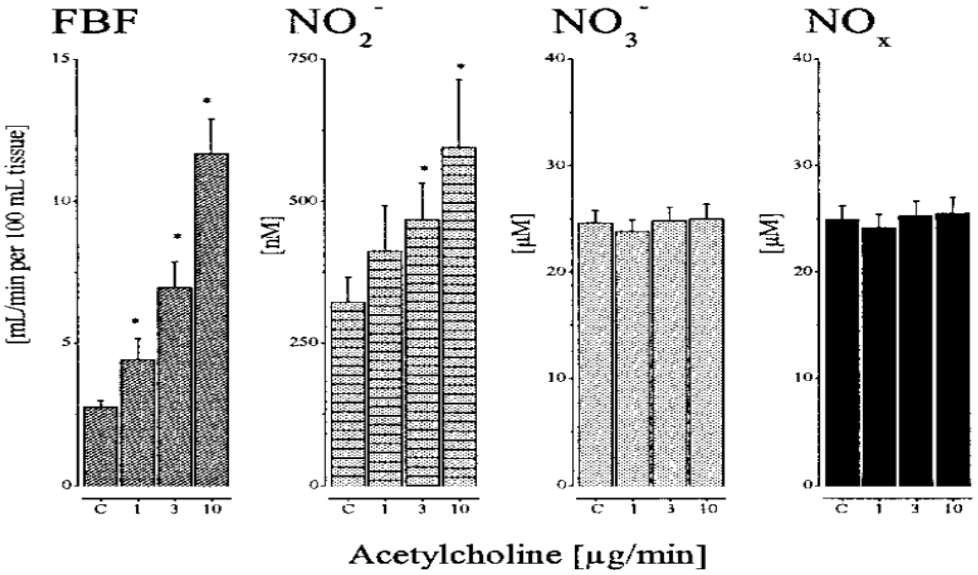


Figure 19 : Variations des nitrites, nitrates, NOx plasmatiques et FBF après administration d'acétylcholine

L'infusion intra-artérielle de doses croissantes d'acétylcholine (0, 1, 3 et 10µg/min) chez des sujets sains (n=24) entraine une augmentation significative du flux sanguin au niveau de l'avant bras (FBF) et des concentrations plasmatiques en nitrites (NO_2^-), en non en nitrates (NO_2^-).

D'après Lauer et al. 2001

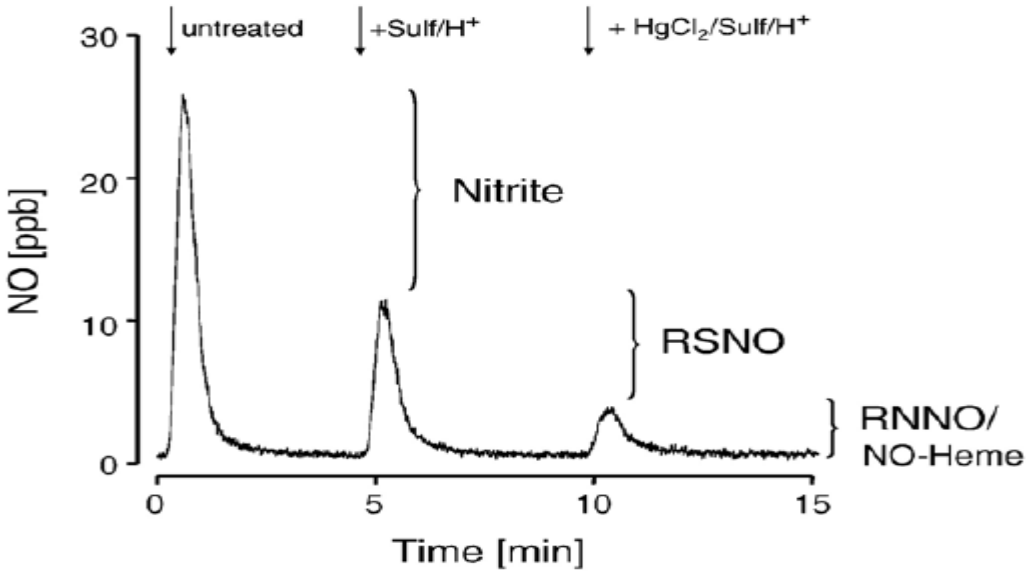


Figure 20 : Exemple de détection des nitrites, nitrosothiols et nitrosamines par chimioluminescence

La pré-incubation d'échantillons de plasma en présence de réactifs tels le sulfanilamide (Sulf) et le chlorure de mercure ($HgCl_2$) permet une réduction successive des nitrites, nitrosothiols et nitrosamines qui peuvent être alors quantifiés par différence.

D'après Bryan et Grisham 2007

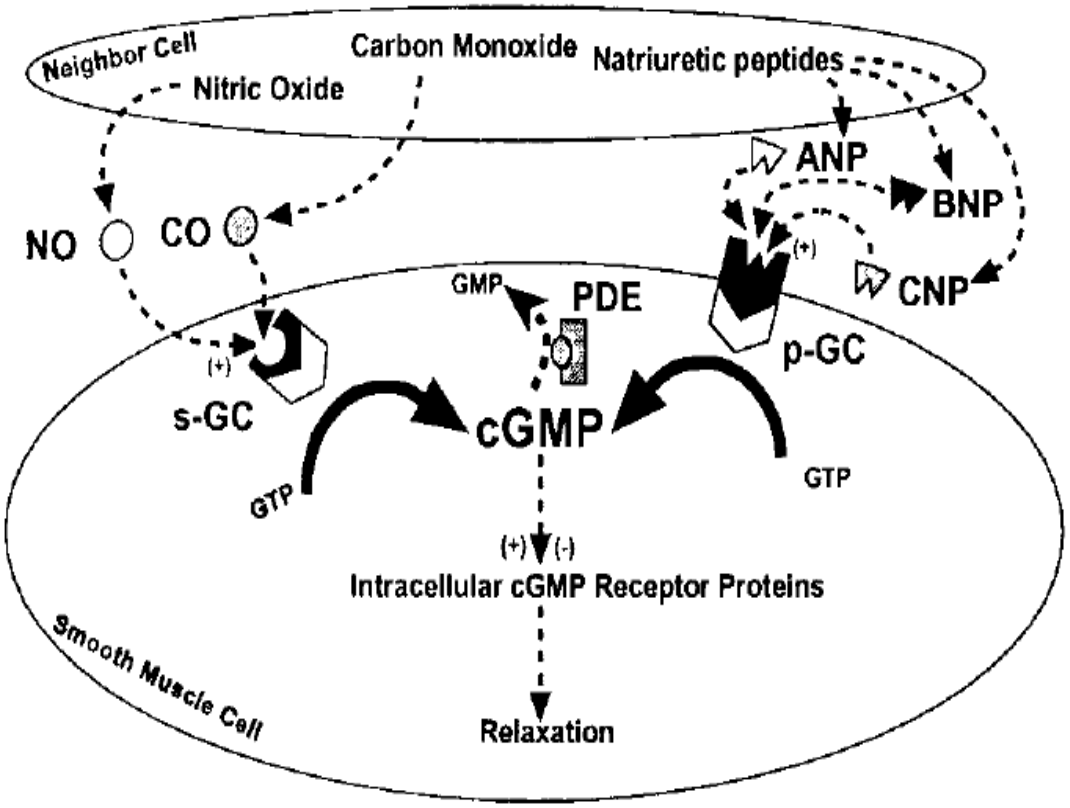


Figure 21 : Deux types de guanylates cyclase au niveau des cellules musculaires lisses
Au niveau des cellules musculaires lisses, le GMPc est synthétisé à partir du GTP par l'activation de deux guanylates cyclase, la guanylate cyclase soluble (s-GC) et la guanylate cyclase membranaire (p-GC). Alors que la s-GC, cystosolique est activée par le NO et le monoxide de carbone, la p-GC est activée par des peptides natriurétiques (ANP: atrial natriuretic peptide; BNP: Brain natriuretic peptide; CNP: C-Type natriuretic peptide).
D'après Carvajal et al. 2000.

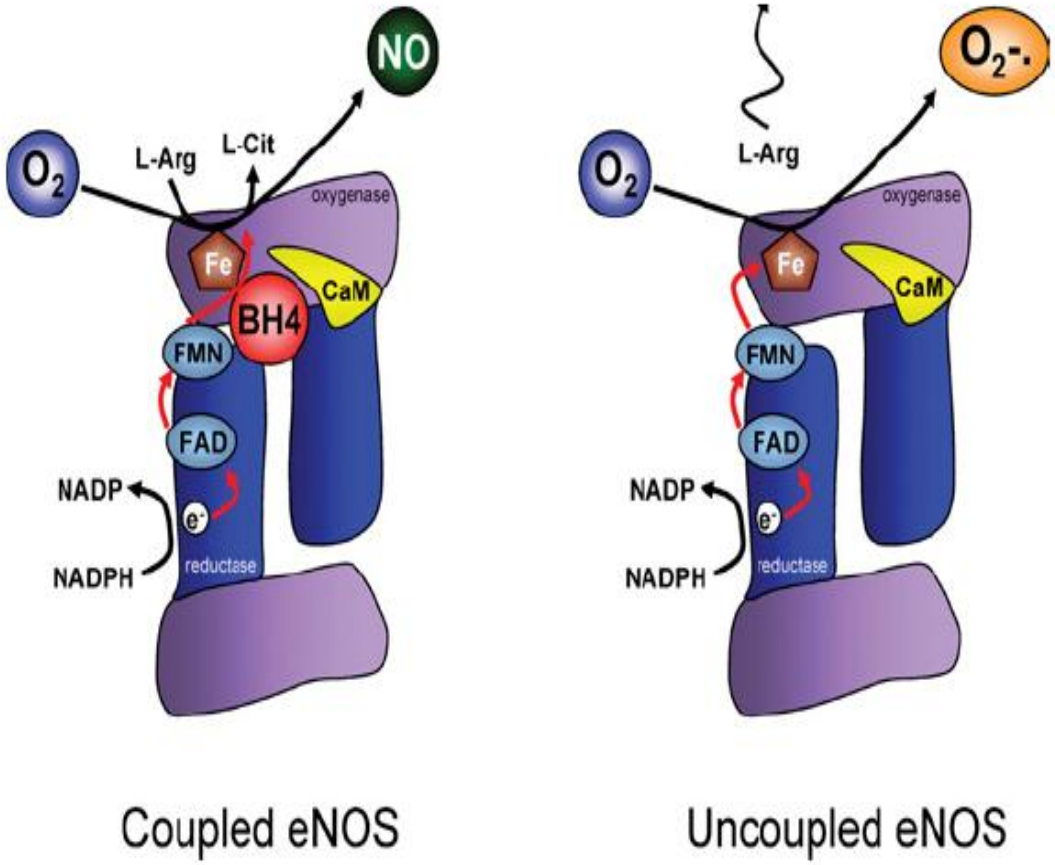


Figure 22 : Production d'anions superoxydes lors du découplage de la NOS
Lorsque l'arginine et la BH_4 sont retrouvés au niveau d'eNOS en quantités suffisantes, le transfert d'électrons du NADPH au groupement hème entraine la synthèse du NO, l'enzyme est sous sa forme couplée, active. Lorsque la BH_4 est retrouvée en quantités limitantes, le transfert d'électrons favorise plutôt la réduction de l'oxygène en anions superoxydes.
D'après Schmidt et Alp 2007

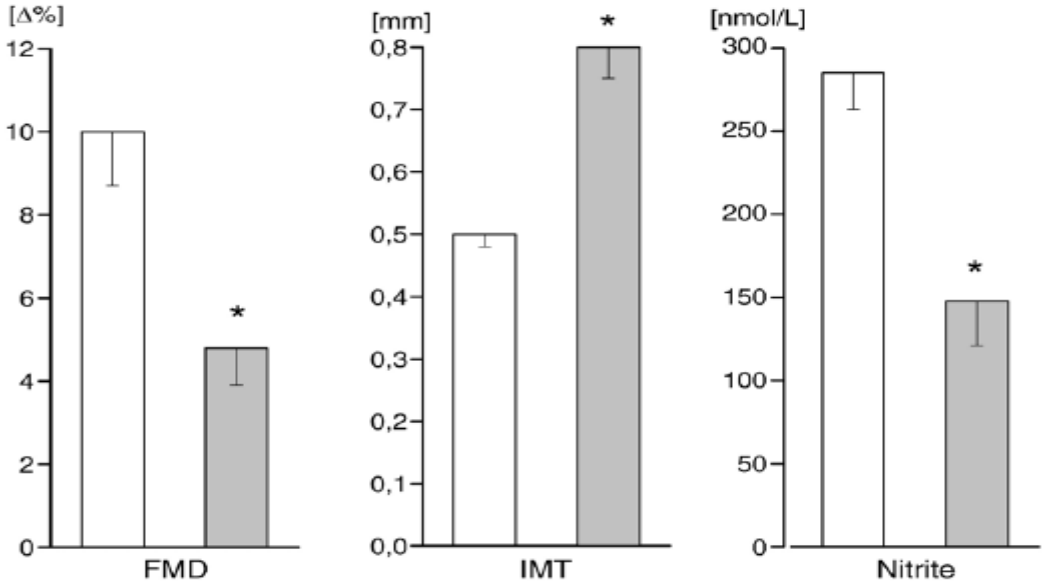


Figure 23 : Dysfonction endothéliale et nitrites plasmatiques
Chez des sujets atteints de pathologies athérothrombotiques et manifestant une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (n=12, barres grisées), les concentrations plasmatiques nitrites sont significativement plus faibles par rapport à celles observées chez des sujets sains (n=12, barres blanches).
D'après Kleinbongard et al. 2006a

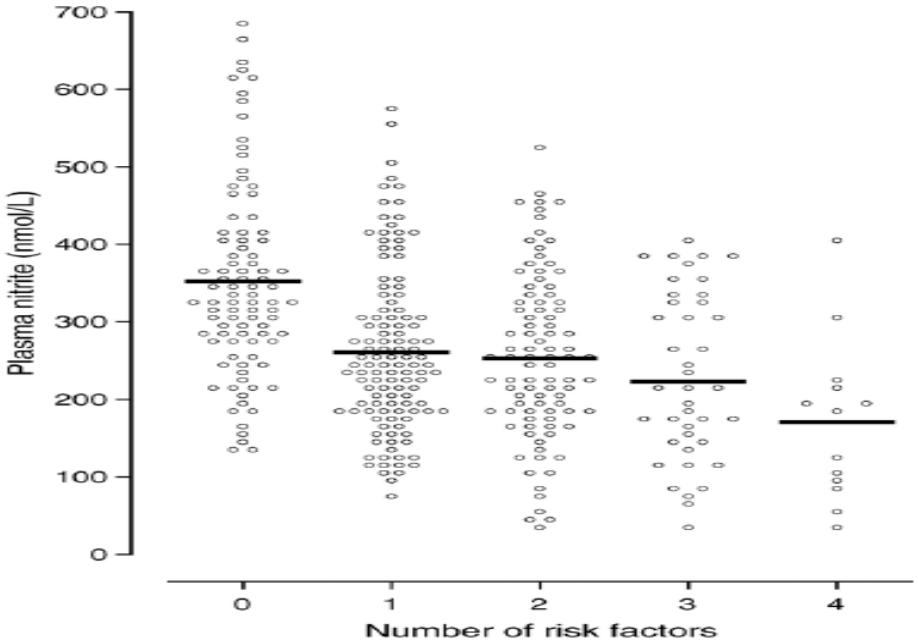


Figure 24 : Risque cardiovasculaire et nitrites plasmatiques
Les concentrations plasmatiques en nitrites observées sur une cohorte (n=351) sont d'autant plus faibles que le niveau de risque cardiovasculaire (stratifié en 5 catégories en prenant en compte des paramètres de BMI, pression artérielle et de profil lipidique) est élevé.
D'après Kleinbongard et al. 2006a

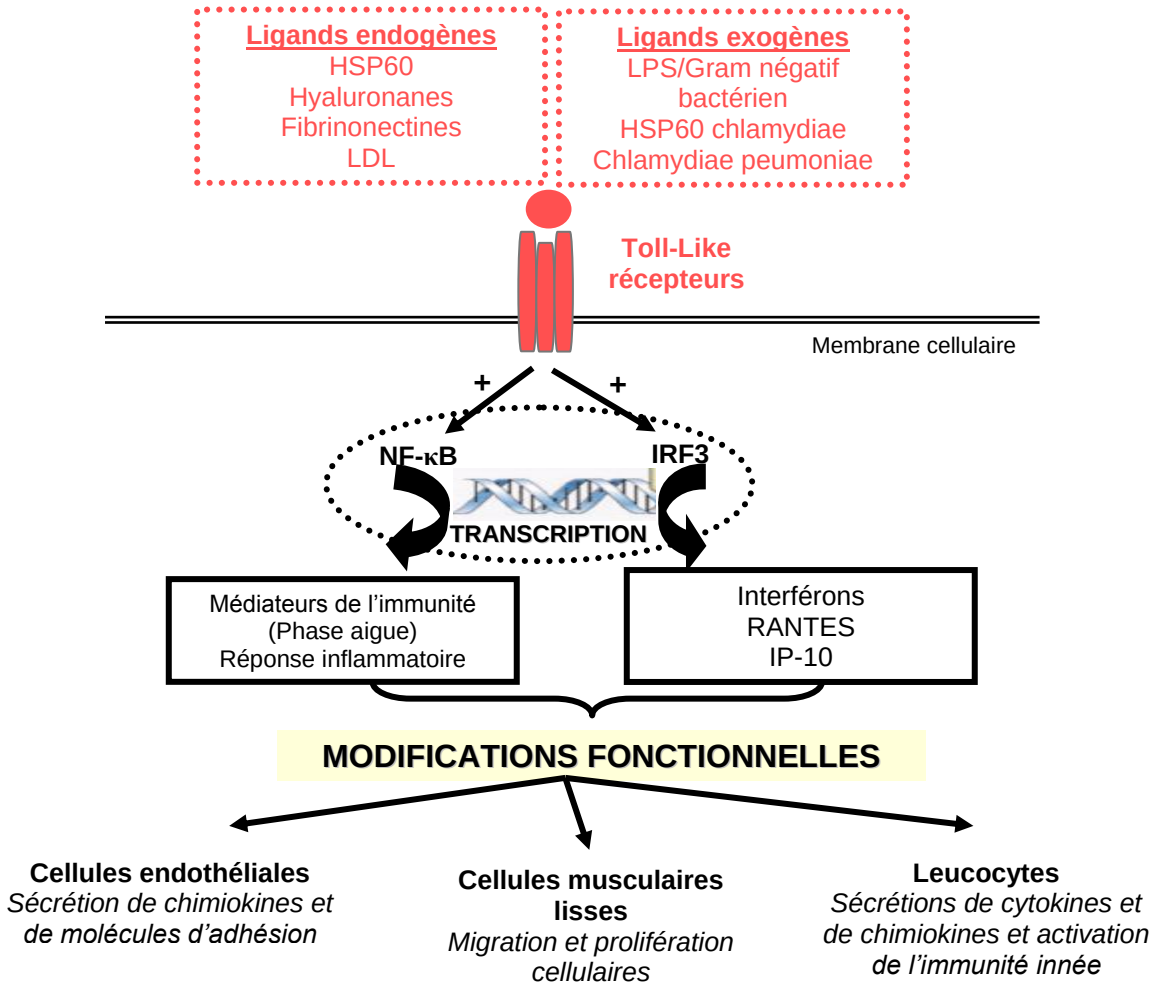


Figure 25 : Voies de signalisation des Toll-like récepteurs
D'après Li et Sun 2007

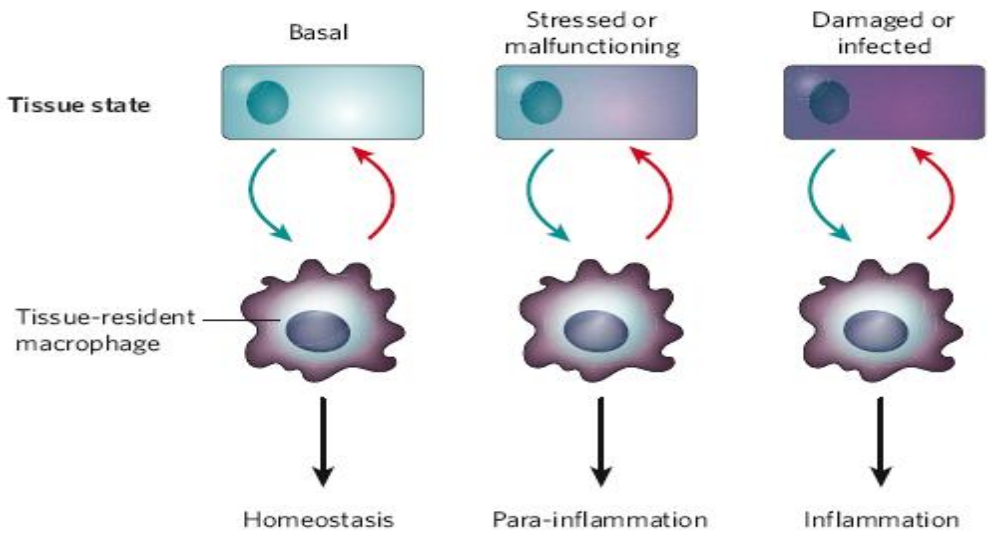


Figure 26 : Notions d'inflammation à bas bruit ou de para-inflammation
Hypothèse selon laquelle le niveau d'inflammation d'un tissu dépend principalement du degré de dérégulations du tissu pouvant être, de façon graduelle, soit stressé ou dysfonctionnant, soit lésé ou infecté. Ces dérégulations des voies de signalisation inflammatoires affectent non seulement l'homéostasie tissulaire in situ mais aussi la réponse adaptative impliquant les cellules circulantes telles les macrophages.
D'après Medzhitov 2008

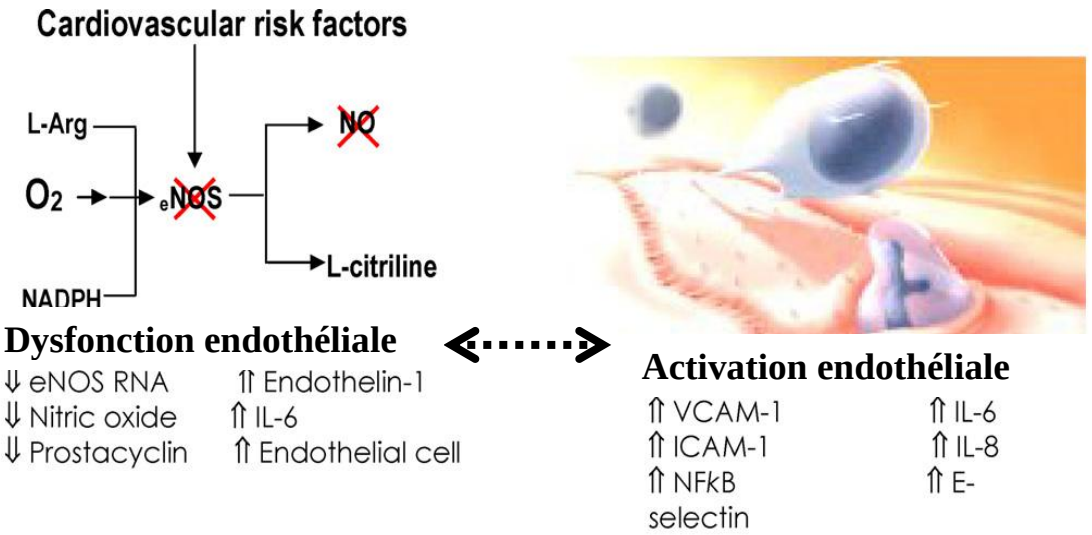


Figure 27 : Dysfonction endothéliale et activation endothéliale
La dysfonction endothéliale est caractérisée principalement par une altération de la réactivité vasculaire NO-dépendante associée à un état pro-inflammatoire. Ces dérégulations physiologiques et métaboliques vasculaires prédisposent la paroi vasculaire à une activation endothéliale définit par une activation des voies de signalisation de l'adhésion leucocytaires.
D'après Grover-Paez et Zavalza-Gomez 2009.

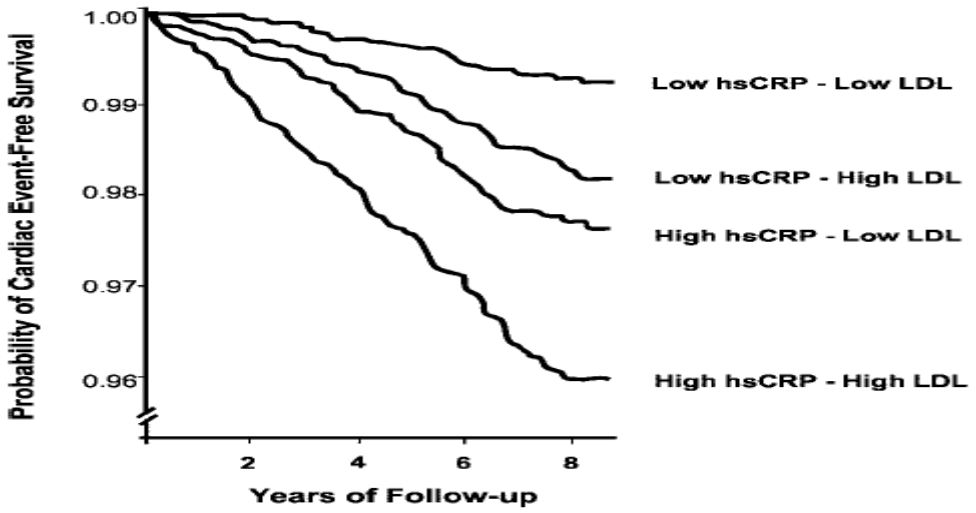


Figure 28 : Courbes de « survie » sans évènements athérothrombotiques selon des taux plasmatiques en CRP et de LDL
Analyse à partir de la « Women health study » selon laquelle il a été montré que le niveau des concentrations plasmatiques en protéine C-réactive ultrasensible (hsCRP) combinée aux taux plasmatiques en cholestérol LDL, prédisait la survenue d'évènements cardiovasculaires athérothrombotiques (Low hsCRP<1mg/L et High hsCRP> 3mg/L)
D'après Ridker et al. 2004

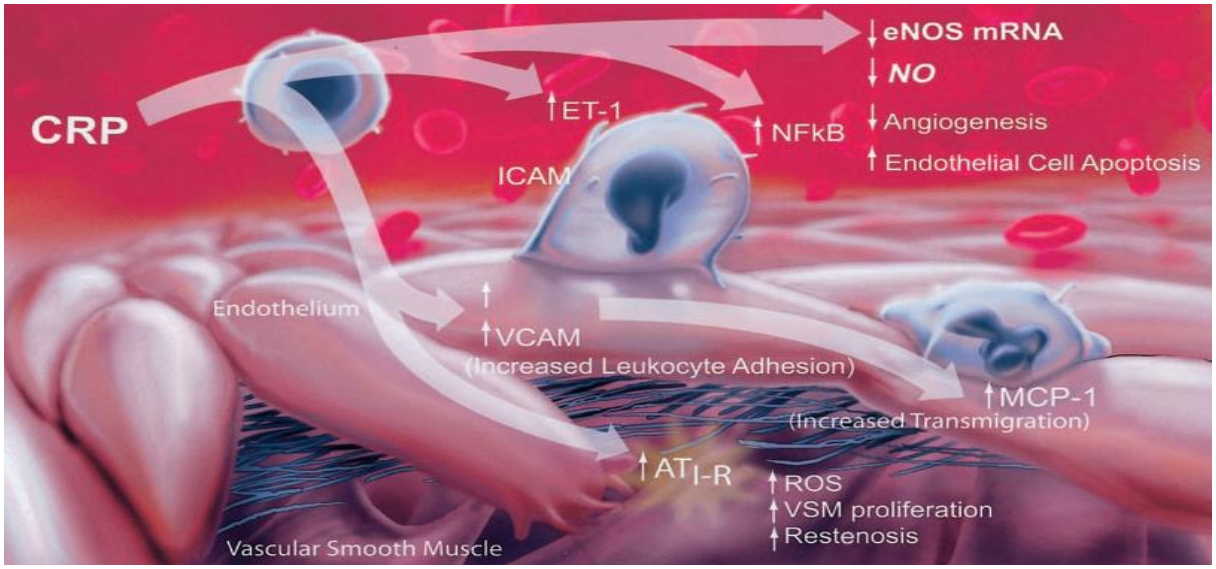


Figure 29 : Impact de la CRP sur l'activation endothéliale
Différentes études ont démontré qu'une augmentation des concentrations plasmatiques en CRP induisait une altération de la synthèse du NO et activait les voies de signalisation de l'angiogenèse, l'adhésion et la migration leucocytaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose.
D'après Szmitko et al. 2003a

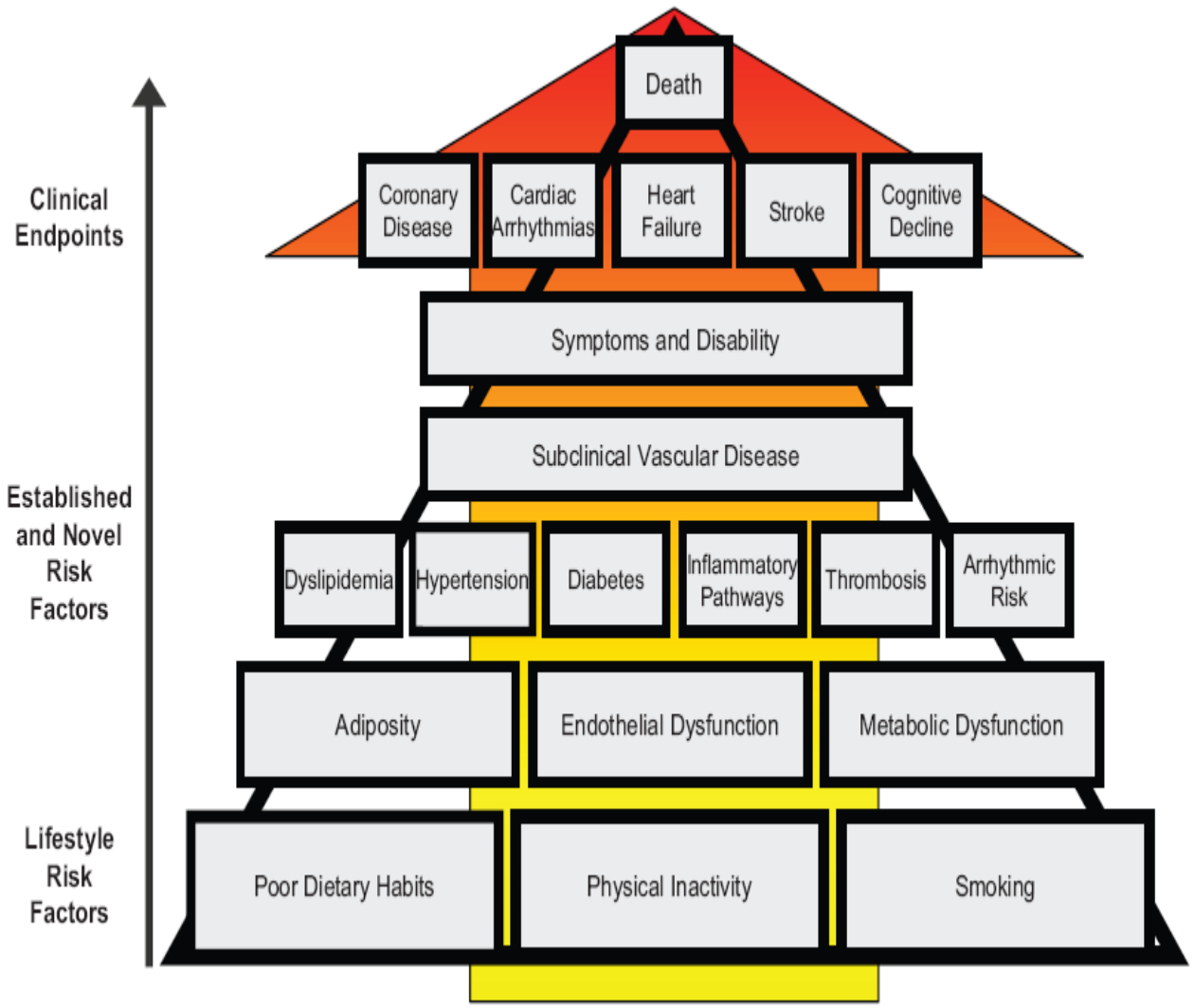


Figure 30 : Dysfonction endothéliale et facteurs de risque cardiovasculaires
Les facteurs de risque cardiovasculaires classiques (dyslipidémie, hypertension artérielle, diabètes, thrombose) sont étroitement associés à des dérégulations métaboliques et physiologiques (l'adiposité viscérale, le syndrome métabolique et la dysfonction endothéliale) qui sont fortement influencés par des facteurs de risque environnementaux prédisposant liés au style de vie (déséquilibre alimentaire, sédentarité et tabagisme)
D'après Mozaffarian et al. 2008

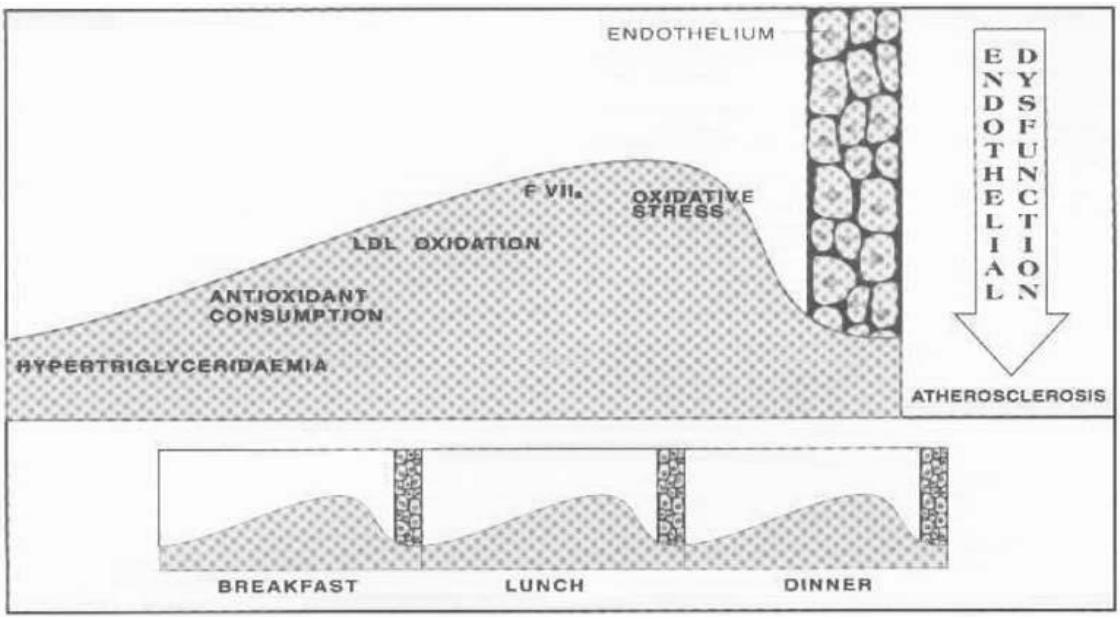


Figure 31 : Dysfonction endothéliale observée pendant la phase postprandiale
Concept de la vague d'évènements indésirables caractérisant la dysfonction endothéliale induite pendant la phase postprandiale.
D'après Ceriello 2003

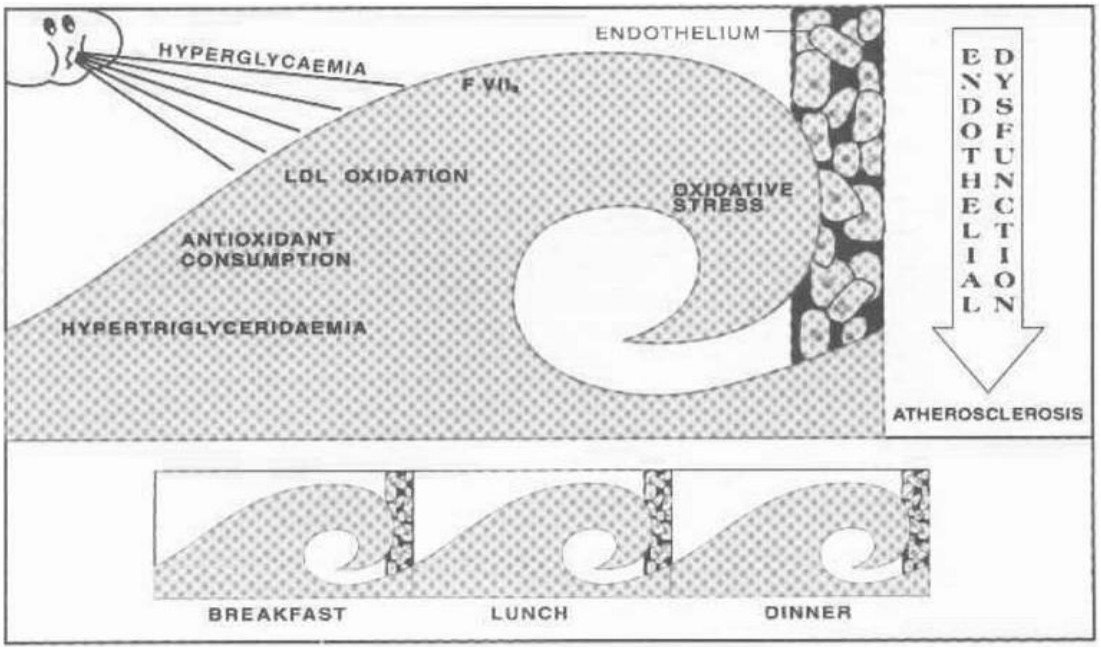


Figure 32 : Hyperglycémie et dysfonction endothéliale postprandiale
Postulat de l'effet de l'hyperglycémie représentée ici comme une forte houle déchainant la vague d'évènements postprandiaux indésirables.
D'après Ceriello 2003

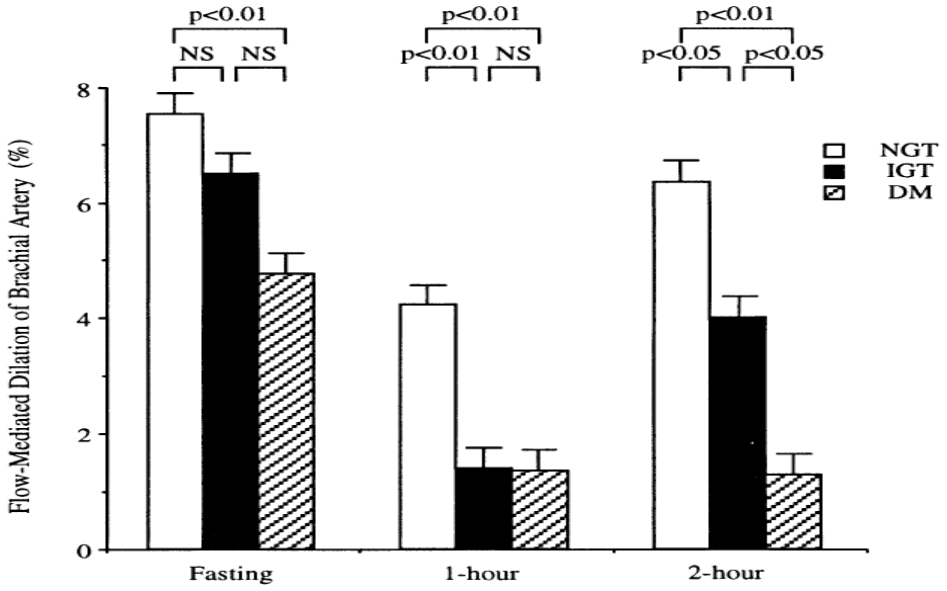


Figure 33 : FMD mesurée avant, 1h et 2h après un TOTG chez des sujets normo-glycémiques, insulino-sensibles ou atteints de DM2.
Chez les sujets normo-glycémiques (NGT, n=17), le TOTG induit une diminution de la FMD seulement 1h après la charge en glucose (75g). Deux heures après le TOTG, une diminution significative de la FMD est observée chez les sujets insulino-sensibles (IGT, n=24) ou atteints de DM2 (DM, n=17) par rapport aux sujets NGT.
D'après Kawano et al. 2003

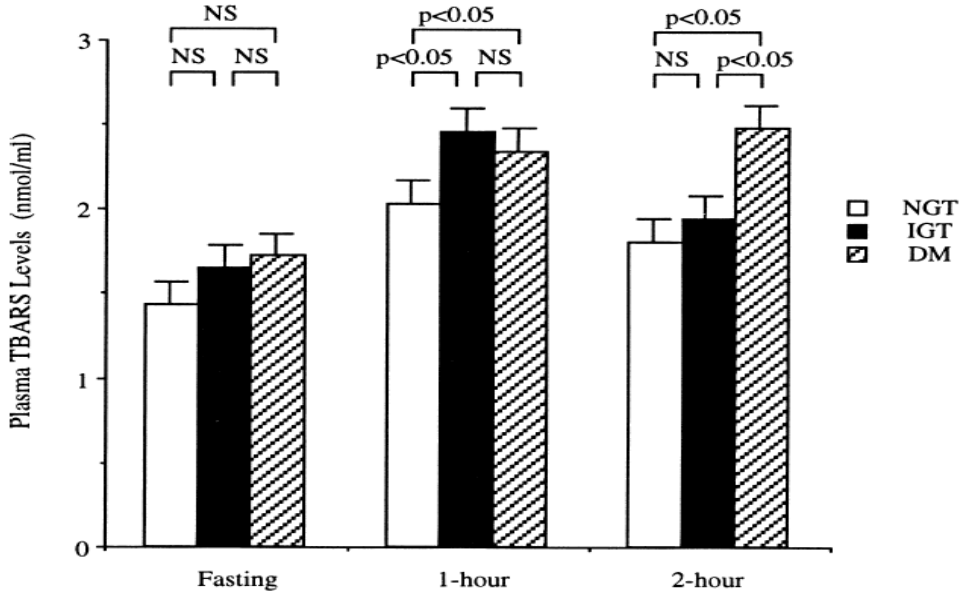


Figure 34 : TBARS plasmatiques mesurés avant, 1h et 2h après un TOTG chez des sujets normo-glycémiques (NGT), insulino-sensibles (IGT) ou atteints de DM2 (DM).
Chez les sujets NGT, IGT et DM, le TOTG induit une augmentation significative des taux plasmatiques en TBARS, 1h après la charge, qui se prolonge 2h après le TOTG uniquement chez les sujets DM.
D'après Kawano et al. 1999

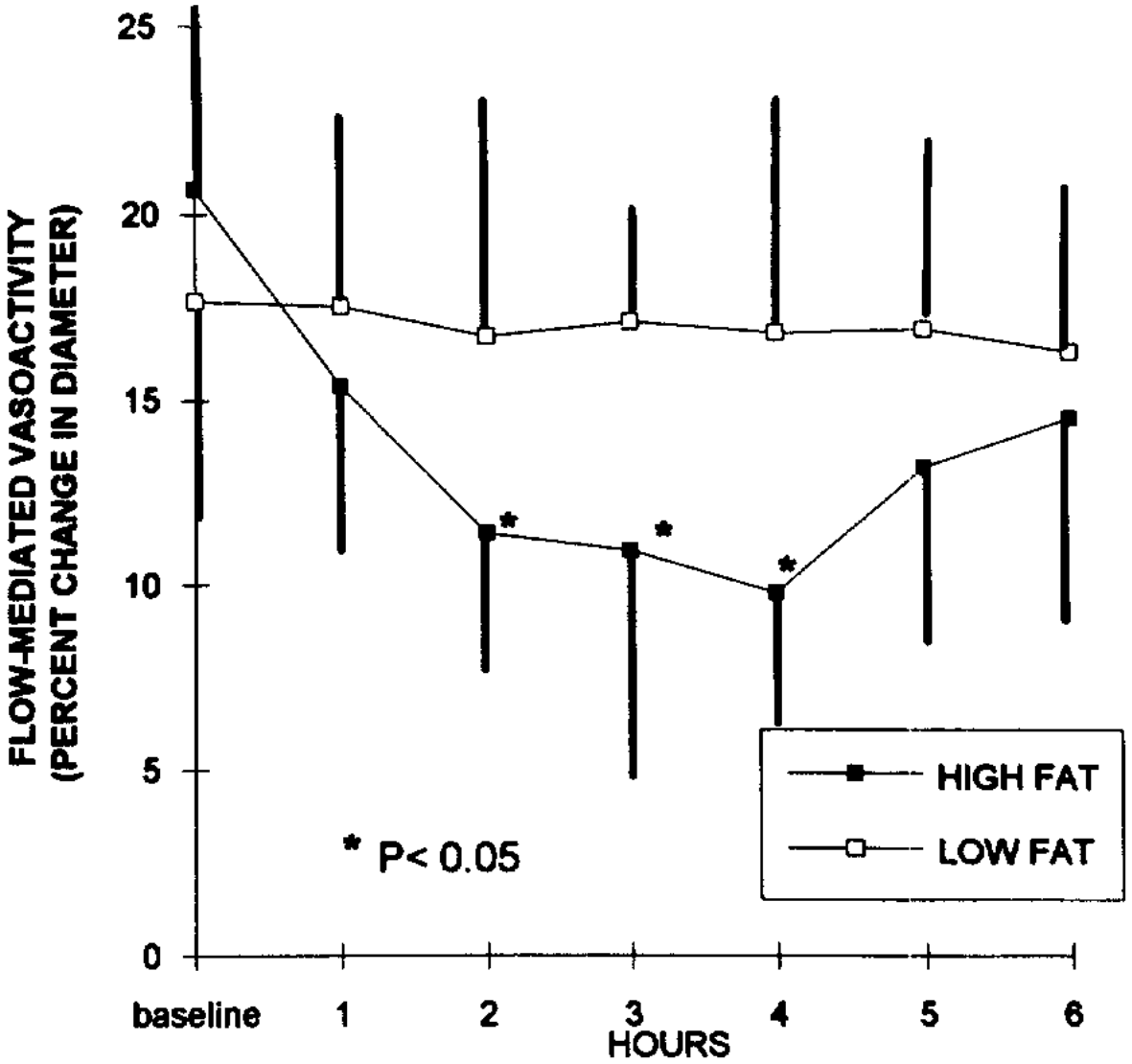


Figure 35 : Altération postprandiale de la FMD après l'ingestion d'un repas hyperlipidique ou de faibles doses de lipides

Première étude à avoir montré une diminution postprandiale de la réactivité vasculaire chez des sujets sains (n=10) après un repas hyperlipidique (High-fat, 900 kCal contenant 50g de lipides) par rapport à un repas contenant de faibles doses en lipides (Low-fat, 900 kCal, 13mg cholestérol).

D'après Vogel et al. 1997

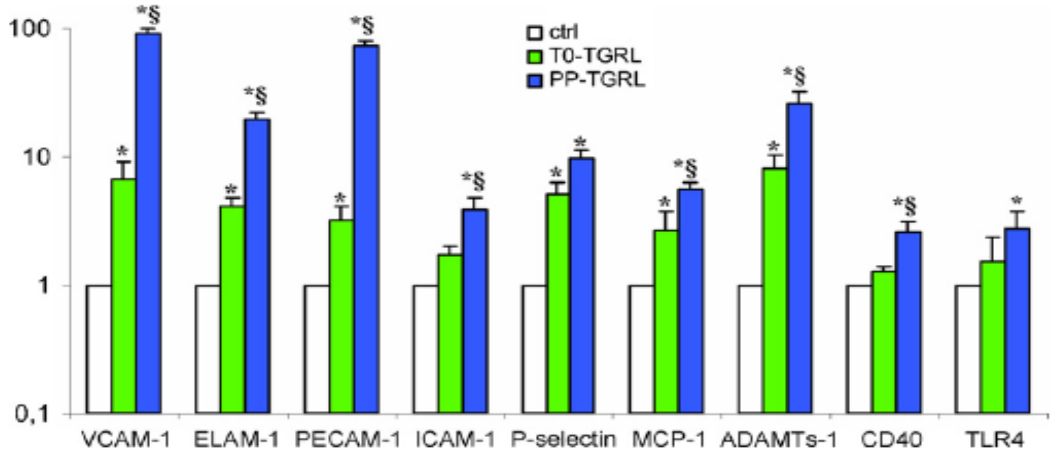


Figure 36 : Expression de marqueurs proinflammatoires au niveau de cellules endothéliales, cultivées en présence de lipoprotéines riches en triglycérides (TGRL)
L'incubation dans le milieu de culture d'HUVEC, de TGRL, prélevés chez des sujets hypertriglycéridémiques, à jeun (T0) ou 4h après l'ingestion d'un repas hyperlipidique (PP, 82% de lipides), induit une augmentation significative de l'expression de marqueurs proinflammatoires. Pour tous ces marqueurs, cette augmentation est beaucoup marquée en utilisant des TGRL prélevés en situation postprandiale.
D'après Norata et al. 2007

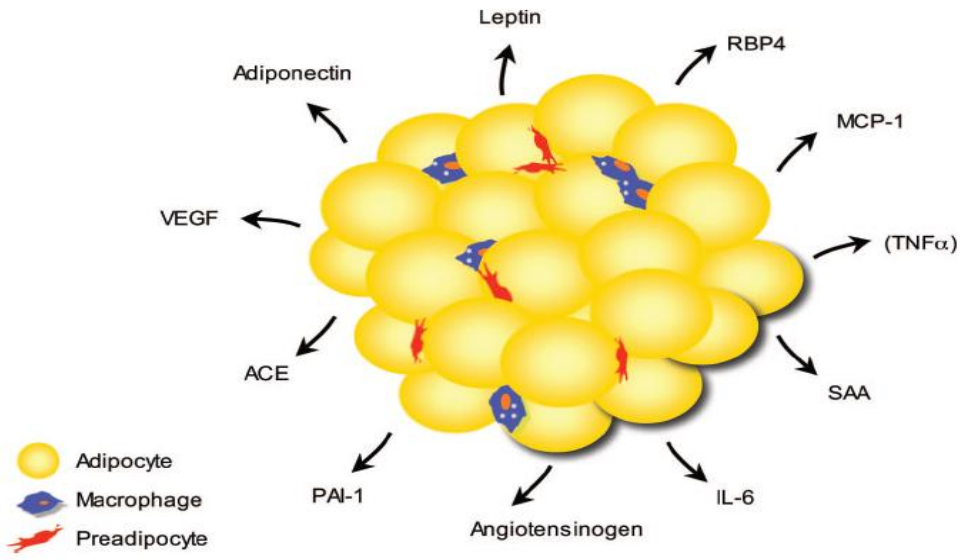


Figure 37 : Le tissu adipeux, un organe endocrine
Quelques exemples des nombreuses adipokines synthétisées et/ou sécrétées par le tissu adipeux (SAA : serum amyloid A, RBP4 : Retinol binding protein 4, ACE : angiotensinogen converting enzyme).
D'après Gustafson et al. 2007

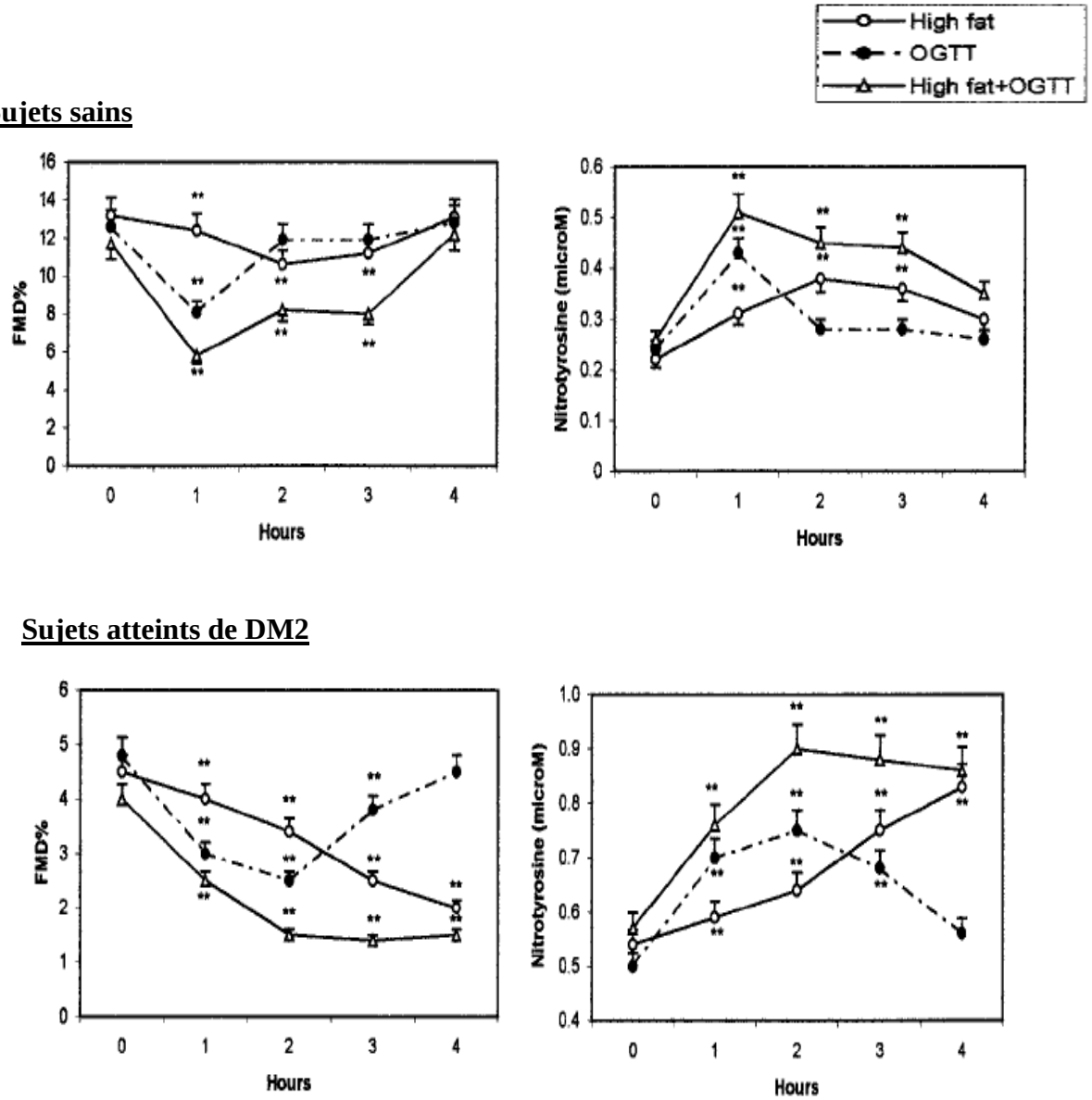


Figure 38 : Effets de repas hyperlipidiques et/ou TOTG sur la FMD et la 3-nitrotyrosine totale plasmatique chez des sujets sains ou atteints de DM2

Chez les sujets sains ou atteints de DM2, la combinaison du TOTG (75g de glucose) au repas hyperlipidique contenant 75g de lipides (High-fat+OGTT) induit une diminution de la FMD et une augmentation des concentrations plasmatiques en 3-nitrotyrosine, de plus grandes amplitudes que celles observées après l'ingestion des charges hyperlipidique ou hyperglucidique, seules.

D'après Ceriello et al. 2002a

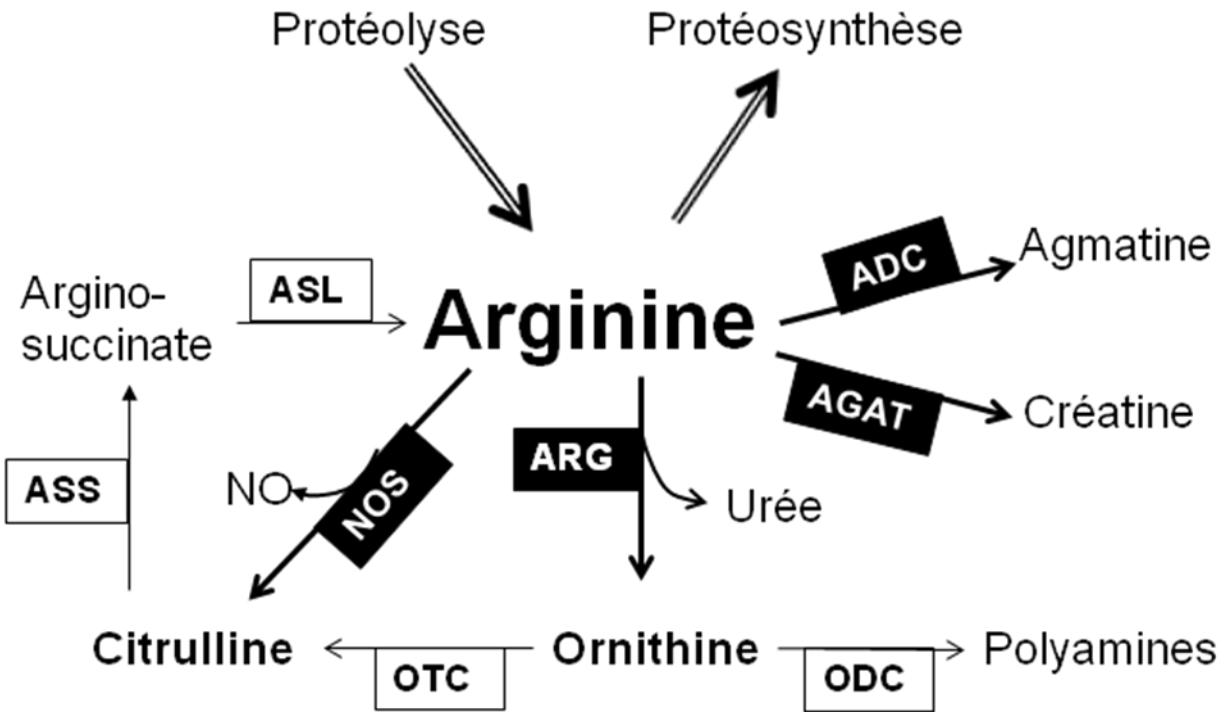


Figure 39 : Métabolisme de l'arginine
Différentes enzymes et voies de synthèse et d'utilisation de l'arginine. (Abbréviations, ADC : arginine decarboxylase ; AGAT : arginine:glycine amidinotransferase; ARG : arginase; ASL : argininosuccinate lyase; ASS : argininosuccinate synthetase; ODC : ornithine decarboxylase; OTC : ornithine transcarbamylase)
D'après Morris 2004

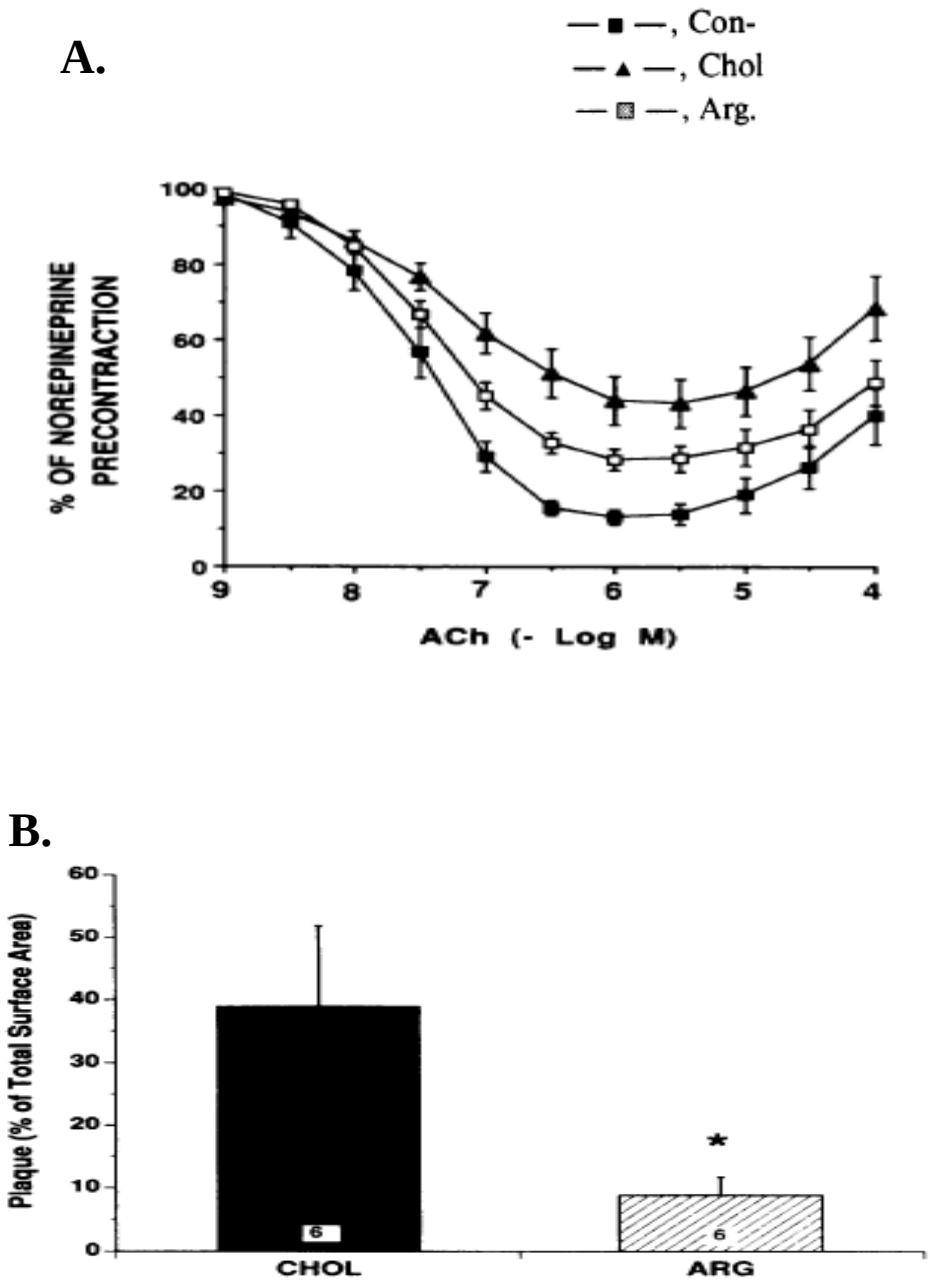


Figure 40 : Effet de supplémentations en arginine sur la fonction endothéliale et la taille des lésions vasculaires chez des lapins hypercholestérolémiques

A. L'altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium mesurée sur des segments d'aortes thoraciques de lapins hypercholestérolémiques (Chol) est significativement réduite lorsque que le régime hypercholestérolémiant est supplémenté en arginine (Arg, 2,25% dans l'eau de boisson pendant 10 semaines). **B.** La taille des lésions vasculaires mesurée par planimétrie après un marquage au « red-oil O » est significativement réduite chez les lapins hypercholestérolémiques ayant reçu une supplémentation en arginine

D'après Cooke et al. 1992

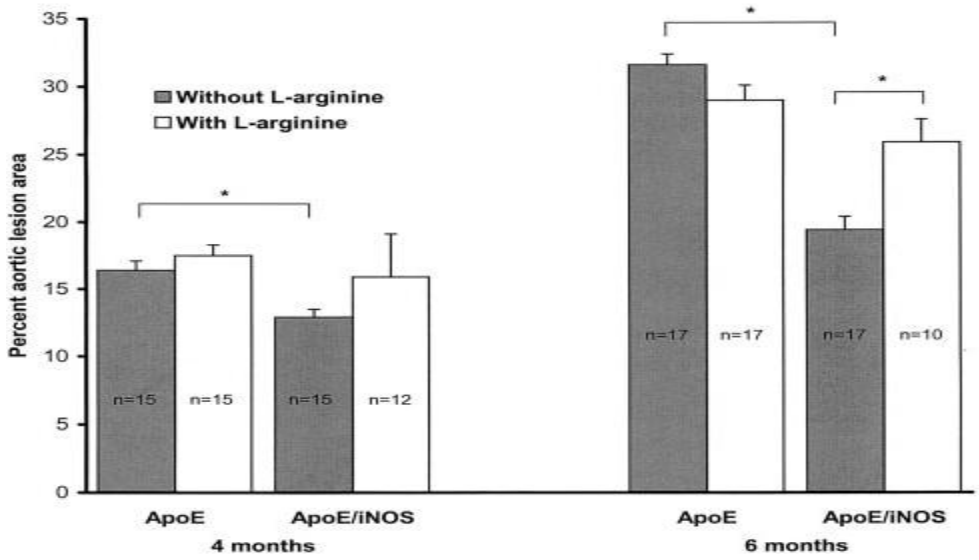


Figure 41 : Effet de supplémentations en arginine sur la taille de lésions athérosclérotiques chez des souris KO ApoE et KO ApoE/iNOS

La taille lésions athérosclérotiques induites par l'ingestion d'un repas hyperlipdique (42% de lipides) pendant 4 mois et 6 mois est significativement plus faibles chez les souris doublement invalidés ApoE/iNOS par rapport aux souris ko-ApoE. Six mois après l'induction hyperlipidique, la taille des lésions athérosclérotiques est significativement augmentée chez les souris ko ApoE/iNOS ayant reçue une supplémentation en arginine (25g/L dans l'eau de boisson).

D'après Chen et al. 2003

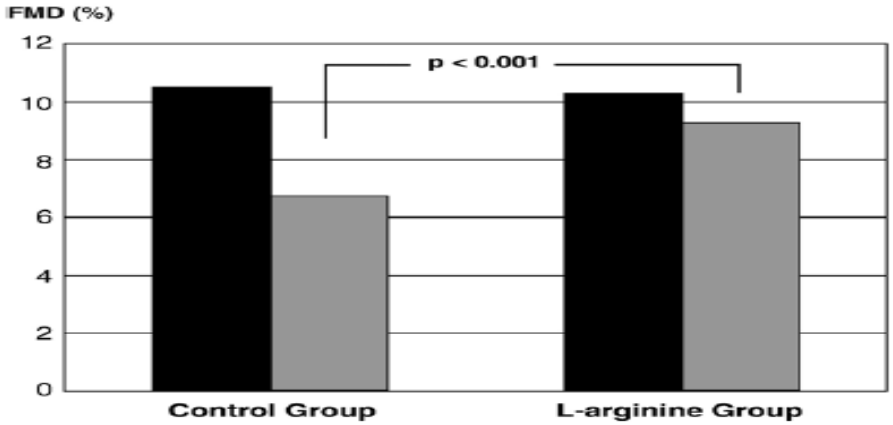


Figure 42 : L'ingestion de 15g d'arginine entraine la réduction de la dysfonction endothéliale postprandiale induite par un repas hyperlipidique.

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

D'après Lin et al. 2008

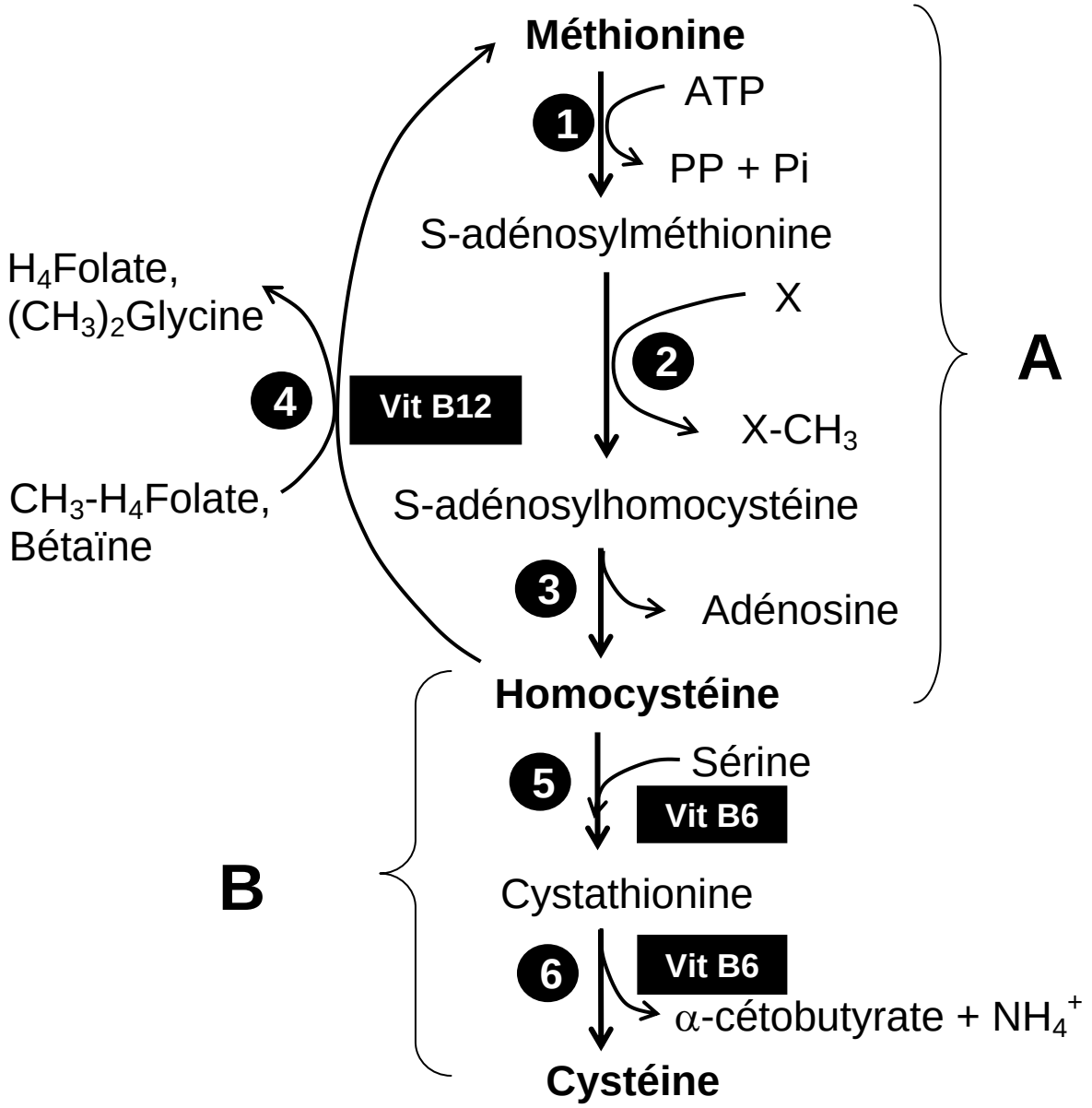


Figure 43 : Métabolisme de la méthionine
A. Voie de transméthylation : 1-Methionine-adénosyle transférase, 2-Méthyltransférase, 3-adénosylhomocystéine hydrolase, 4-Méthionine synthase ou Bétaïne-homocystéine méthyltransférase ;
B. Voie de transulfuration **:** 5-Cystathionine-β-synthase, 5-Cystathionine-γ-lyase
D'après Huneau et al. 2008

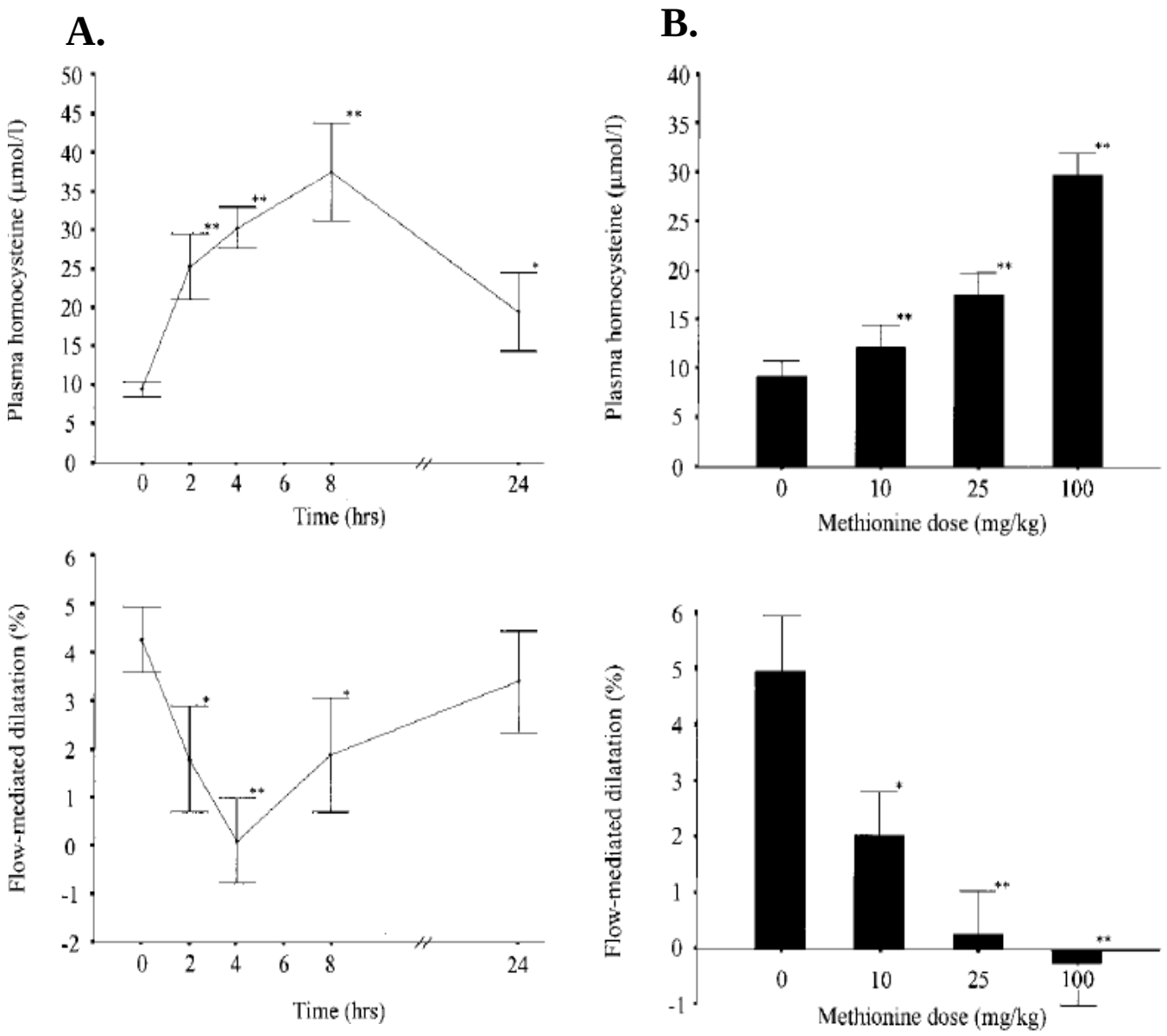


Figure 44 : Homocystéine plasmatique et FMD observée pendant les 24h suivant une charge en méthionine et 4h après différentes doses en méthionine

A. Augmentation des concentrations plasmatiques d'homocystéine et diminution de la FMD observée chez des sujets sains (n=18) après l'ingestion d'une charge orale en méthionine (100mg/kg). **B.** Effet dose-réponse observé sur les taux plasmatiques en homocystéine plasmatique et sur la FMD.

D'après Chambers et al. 1999

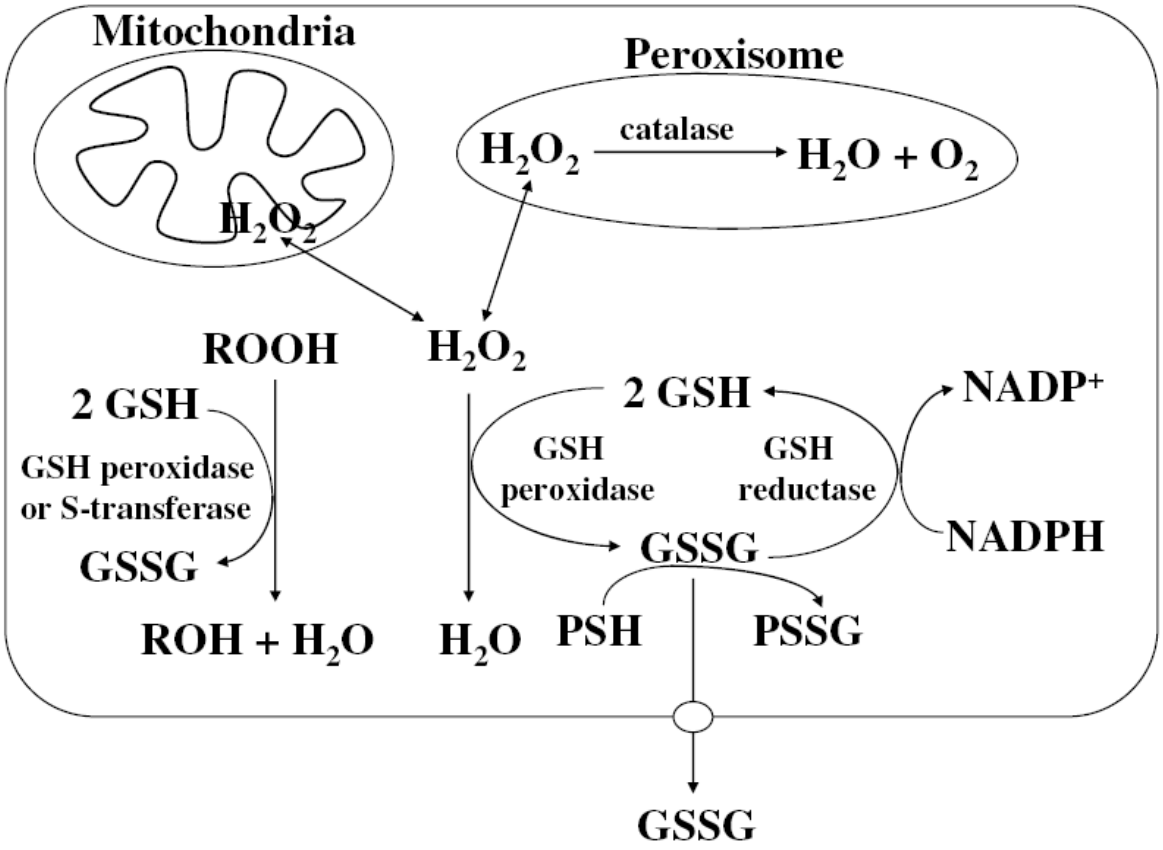


Figure 45 : Voies d'action du glutathion au niveau cellulaire
Les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) cellulaires, synthétisés de façon aérobique, peuvent être métabolisés dans le cytosol et la mitochondrie par la glutathion peroxidase, et produire ainsi du glutathion oxydé (GSSG) à partir du glutathion réduit (GSH). Le GSH produit peut être rapidement recyclé à partir du GSSG, sous l'action de la GSH réductase, oxydant le NADPH en $NADP^+$. Ce cycle redox est également initié par des péroxydes organiques (ROOH).
En situation de stress oxydant sévère, la capacité de recyclage du GSSG en GSH est mise à mal. Afin d'éviter un déséquilibre du statut rédox cellulaire, le GSSG peut être exporté et/ou réagir avec des groupements sulfhydriles des protéines (PSH), métabolisés alors en sulfhydriles mixtes (PSSG).
D'après Lu 2008

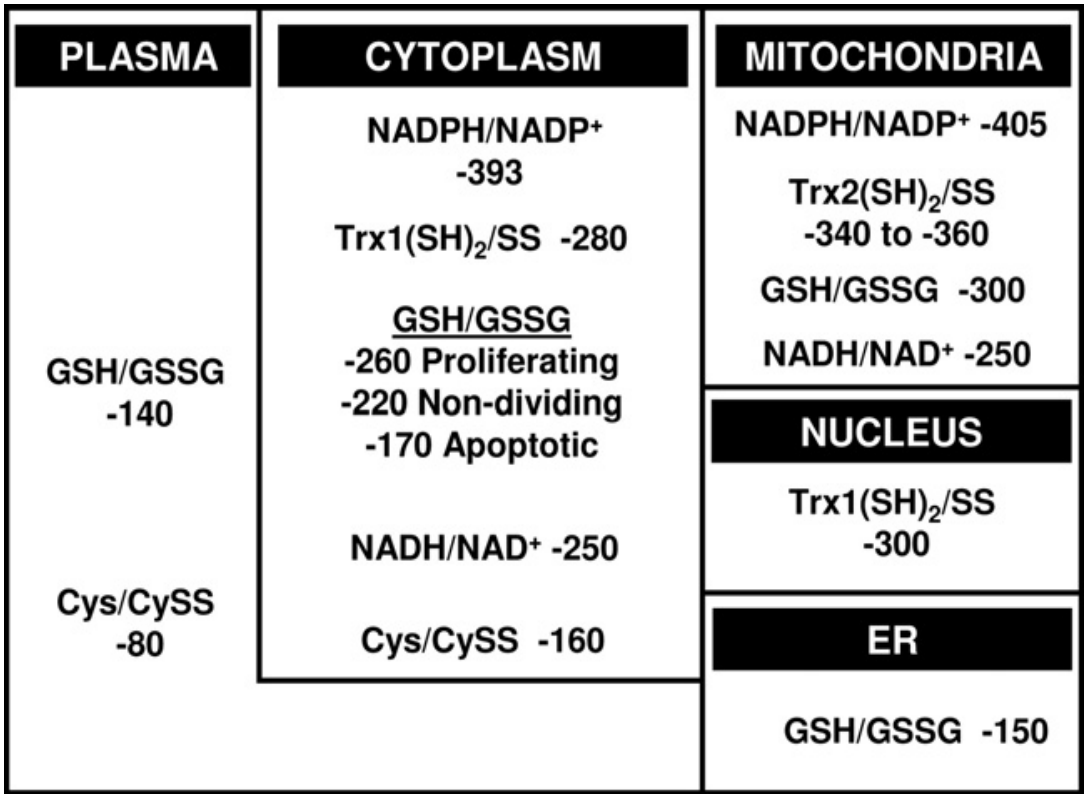


Figure 46 : Compartimentation cellulaire et subcellulaire des couples redox thiols/disulfures

Aperçu des données récentes provenant de plusieurs méthodes ayant évalué le statut des principaux couples redox dans les différents compartiments cellulaires.

Dans le cytoplasme, notons que le statut redox du couple GSH/GSSG est plus réduit sur des cellules prolifératives que sur des cellules apoptotiques. Notons également que les pools en Cys/Cyss et en GSH/GSSG sont plus oxydés au niveau extracellulaire, plasmatiques par rapport au cytoplasme. Le statut redox protéine de thiorédoxine 1 (Trx1) contenant un motif dithiol a été mesuré dans le noyau. A ce jour, le statut nucléaire redox du couple GSH/GSSG n'a pas encore été évalué.

D'après Kemp et al. 2008

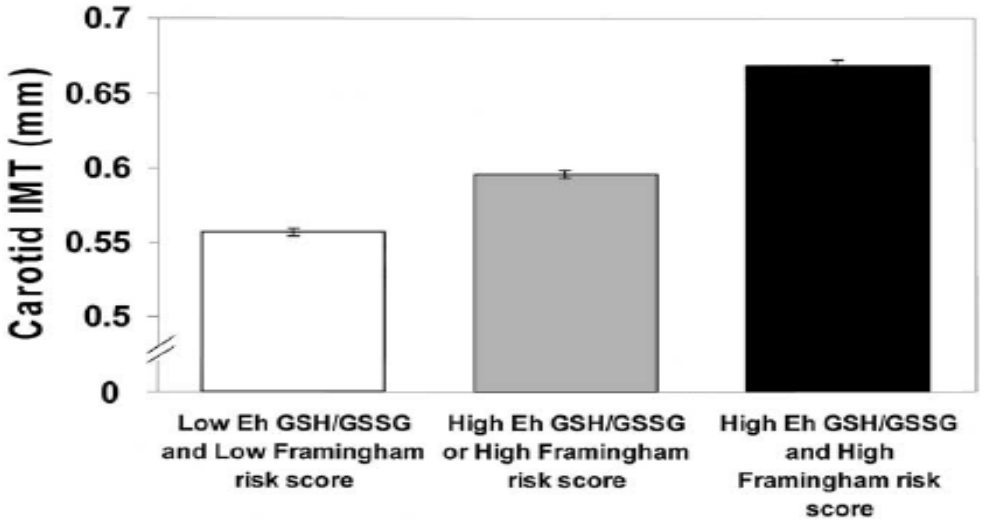


Figure 47 : Valeur pronostic du potentiel redox de couple GSH/GSSG combinée à l'équation de Framingham chez des sujets sains.
Sur une cohorte de 124 sujets sains, divisés en tertiles selon le score de Framingham (< ou > 0) et selon le potentiel redox plasmatique du couple GSH/GSSG (Eh < ou > -126 mV), l'épaisseur media-intima carotidienne est d'autant plus élevée que le niveau de stress oxydant est élevé, et ce de façon indépendante du niveau de risque cardiovasculaire évalué par le score de Framingham.
D'après Ashfaq et al. 2006

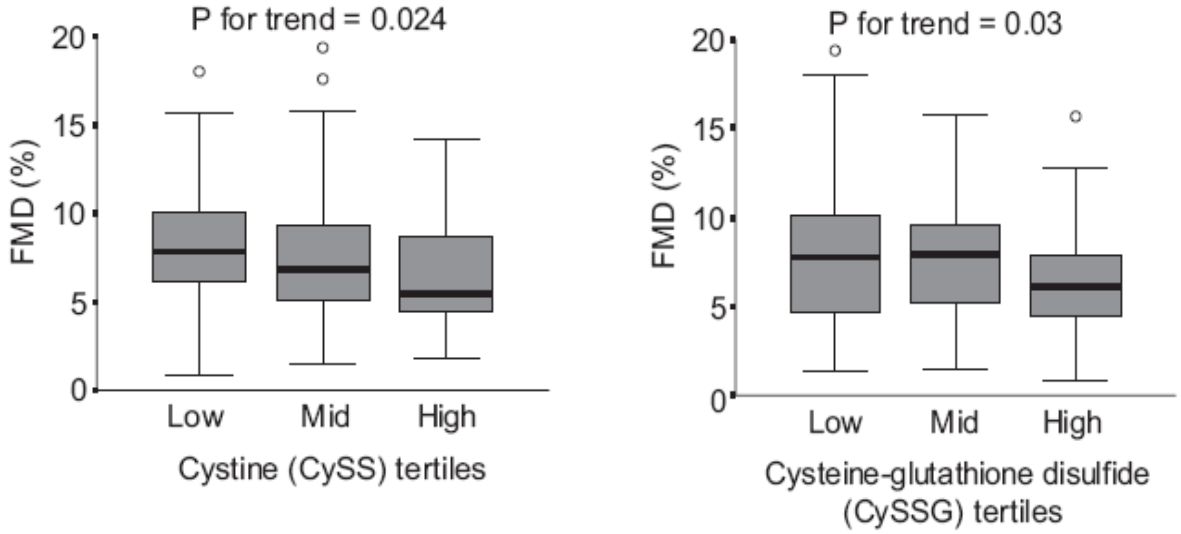


Figure 48 : FMD mesurée chez des sujets sains selon des tertiles de la cystine ou de son disulfure mixte plasmatiques
Sur une cohorte de 124 sujets sains, divisés en tertiles selon les concentrations plasmatiques en cystine ou en son disulfure mixte, la FMD observée est d'autant plus réduite que les taux plasmatiques en cystine sont élevés.
D'après Ashfaq et al. 2008

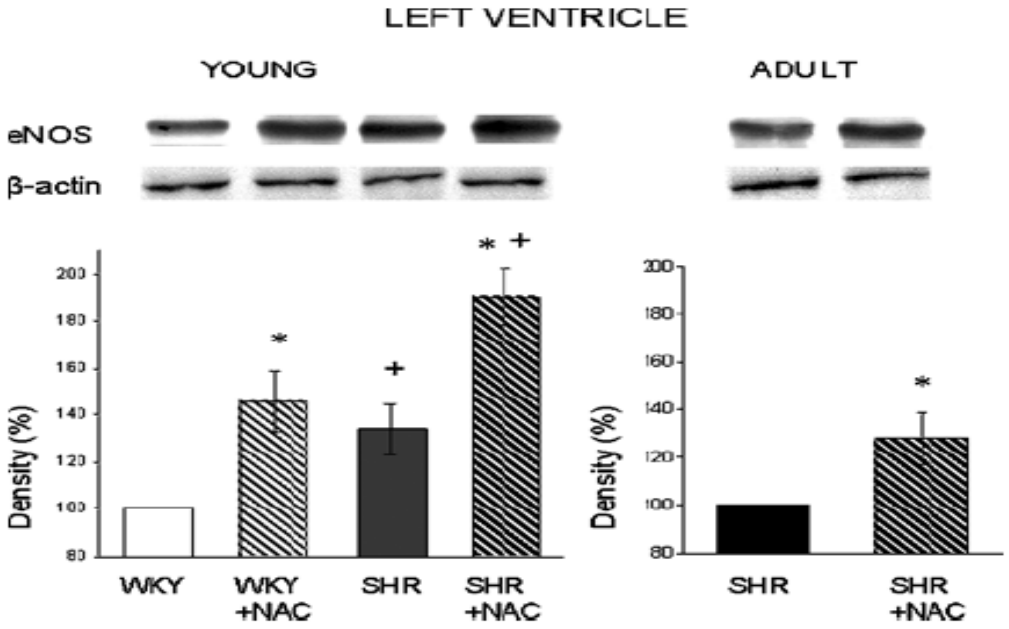


Figure 49 : Expression d'eNOS au niveau cardiaque, chez des rats hypertendus après une supplémentation en NAC
Chez des rats hypertendus (SHR) et des rats sains normo-tendus Wistar-kyoto (WKY) ayant reçu une supplémentation en N-acétylcystéine (NAC, 20g/j pendant 8 semaines dans l'eau de boisson) l'expression d'eNOS au niveau du ventricule gauche est significativement augmentée par rapport aux celle observée chez les rats témoins non traités.
D'après Pechanova et al. 2006

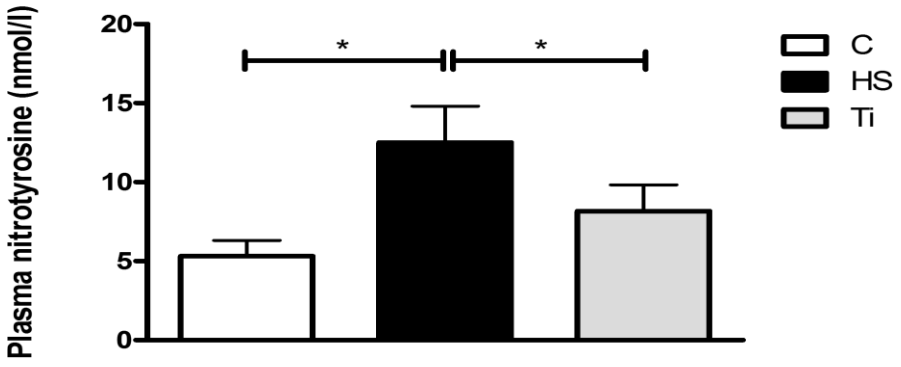


Figure 50 : Effet d'une supplementation en cystéine ou d'un apport en protéines du lactosérum enrichies en α-lactalbumine sur la nitrotyrosine plasmatique chez des rats ayant reçu un repas hypersaccharosé
Chez des rats sains ayant reçu un repas hypersaccharosé (HS, 720g de saccharose/kg d'aliments pendant 6 semaines), une supplémentation en cystéine par du NAC (C) ou par un apport en protéines du lactosérum enrichies en α-lactalbumine (Ti) induit une diminution significative des concentrations plasmatiques en nitrotyrosine.
D'après Blouet et al. 2007

Tableau 1 : Forte corrélation entre l' hypertriglycéridémie et la dysfonction endothéliale vasculaire postprandiale dans la phase postprandiale.

Etude	**Année**	**Sujets** *(sexes ; âges)*	**Repas hyperlipidiques** *avec quantités de lipides ajoutés*	**Apport E du repas** (kcal)	**HTG induite** (%) et temps	**Exploration de la fonction vasculaire**	**Résultats**	**Corrélation avec HTG**
Vogel et al.	1997	10 sujets **sains** (5H, 5F; 29-49 ans)	2 Repas mixtes type petit déjeuner fast-food *soit **50g Lipides (50% AGS)** soit 0g Lipides*	803	70 (6h)	FMD	↘ FMD *(-50% à 4h)*	R=-0.51
Boquist et al.	1999	96 sujets **sains** (50H, 46F; 50 ans)	Repas mixte ***65g lipides ~60%E***	1000	100 (3h)	IMT	↘ IMT	R=-0.29
Marchesi et al.	2000	10 hommes **sains** (21-25 ans)	Repas mixte type petit déjeuner fast-food ***65g/m² lipides***	730	110 (4h)	FMD	↘ FMD *(pic à 2 et 4h ; -75%).*	R=-0.70
Raitakari et al.	2000	12 sujets **sains** (7H, 5F; 18-45 ans)	2 Repas mixtes ***61g lipides** dont soit 48% AGS soit 80% AGMI*	1030	120 (6h)	FMD, FBF	↘ FBF	R=-0.77
Bae et al.	2001	20 sujets **sains** (10H, 10F; 44-68 ans)	2 Repas mixtes *soit **53g lipides** ~ 60%E soit 3g de lipides et 175g glucides*	1030	35 (2h)	FMD	↘ FMD *(~ 40% à 2H)*	R=-0.65
Gaenzer et al.	2001	17 hommes **sains** (29-43 ans)	Repas mixte (crème fouettée) ***65g lipides***	1000	130 (4h)	FMD	↘ FMD *(-100% à 4h)*	R=-0.81
Shimabukuro et al.	2007	12 sujets **sains** (6H, 6F; 30-42 ans)	3 Repas mixtes *soit **30g/m² lipides ~35%E** soit 100% glucides soit 33% lipides, 50% Glucides,*	900	80 (4h)	FBF	↘ FBF *(-20% à 2h).*	R=-0.53 avec AGL

HTG: Hypertriglycéridémie; AGS, Acides gras saturés; AGMI: Acides gras monoinsaturés; AGL: Acides gras libres; E: énergie; FMD: Forearm mediated Vasodilatation; IMT: Intima media Thickness; FBF: Forearm blood flow;

Tableau 2 : Etudes n'ayant pas rapporté d'altération postprandiale de la fonction endothéliale vasculaire.

Etude	**Année**	**Sujets** *(sexes ; âges)*	**Repas hyperlipidiques** *avec quantités de lipides ajoutés*	**Apport E du repas** (kcal)	**HTG induite** (%) et temps	**Exploration de la fonction endothéliale**	**Résultats**	**Observations/ explications**
Djousse et al.	1999	13 sujets **sains** (7H, 6F; 23-41ans)	Repas mixte type fast food ***48% E lipides*** *avec ou sans 3mL/kg de vin rouge*	1000	100 (5h)	FMD	**-**	position différente des ballonnets d'occlusion
Gudmundsson et al.	2000	15 sujets **sains** (11H, 4F; 27-32 ans)	2 Repas mixtes *soit **50g lipides,*** soit 4g lipides, 210g Glucides*	910	50 (4h)	FBF (microcirculation)	**-**	microcirculation
Schillaci et al.	2001	10 femmes **saines** (21-25 ans)	Repas mixte ***65g lipides***	1030	65 (4h)	FMD	**-**	
De Roos et al.	2002	21 hommes **sains** (sup 35 ans)	2 Repas mixtes ***79g lipides*** *soit huile de palme soit AG hydrogénés*	1178	ND	FMD	**-**	
Strey et al.	2004	19 femmes **saines** et 10 femmes **DM2**	Repas mixte type petit déjeuner ***55% lipides*** *avant et 3 mois après contrôle glycémique*	660	54 (3h)	FBF	**-**	quels que soient sujets sains ou diabétiques
Padilla et al.	2006	8 sujets **sains** (5H, 3F; 24-26 ans)	2 Repas mixtes *soit **48g lipides** ; soit 0g lipides, 209g Glucides, avec ou sans exercice d'aérobic 2h avant repas*	940	ND	FMD	**-**	↗ FMD chez sujets ayant fait de l'exercice

HTG: Hypertriglycéridémie ; E : energie ; ND: non décrits; AG : acides gras ; FMD: Forearm mediated Vasodilatation ; FBF: Forearm blood flow ; '-' : pas d'effet sur la fonction endothéliale ; DM2 : Diabète de type 2

Tableau 3 : Qualité des acides gras et dysfonction endothéliale postprandiale.

Etude	**Année**	**Sujets** *(sexes ; âges)*	**Repas hyperlipidiques** *avec quantités de lipides ajoutés*	**Apport E du repas** (kcal)	**HTG induite** (%) et temps	**Exploration de la fonction endothéliale**	**Résultats**	**Observations**
Williams et al.	1999	10 hommes **sains** (34-52 ans)	2 Repas mixtes *soit **64g lipides** huile de cuisson déjà utilisée ou non utilisée soit 18g lipides*	750	93 (3h)	FMD	↘ FMD *(-86%)*	seulement pour les huiles déjà utilisées
Raitakari et al.	2000	12 sujets **sains** (7H, 5F; 18-45 ans)	2 Repas mixtes ***(61g lipides)*** *soit 48% AGS soit 80% AGMI*	1030	120 (6h)	FBF	-	quel que soit le repas
Williams et al.	2001	14 hommes **sains** (34-52 ans)	Repas mixte *contenant mélange d'huiles d'olive et de tournesol utilisées pendant 8h en friture*	900	63 (4h)	FMD	-	quelque soit huiles utilisées
Ruano et al.	2005	21 sujets **hypercholestérolémiques** (5H, 7F ; 53-68 ans)	2 Repas mixtes (*contenant huile d'olive ,40mL) soit 400 ppm, soit 80 ppm d'acides phénoliques/m²*	ND	ND	Réactivité vasculaire	↘ Réactivité vasculaire	Effet bénéfique des acides phénoliques
West et al.	2005	18 sujets **DM2** (13H, 5F ; 53-57 ans)	3 Repas mixtes ***(72% lipides)*** *soit mélange AGMI huile canola et tournesol; soit remplacement 7-8% AGMI par huile de sardine EPA, DHA; soit mélange d'huile de colza et de lin*	528	75 (4h)	FMD	↘ FMD	Seulement chez les AGMI, pas d'effet des AGPI
Cortes et al.	2006	12 sujets **sains** (9H, 3F;24-40 ans) , 12 sujets **hypercholestérolémiques** (11H, 1F; 32-58 ans)	2 Repas mixtes ***(63% lipides dont 37% AGS)*** *soit huile d'olive soit huile de noix*	1700	60 (4h)	FMD	↘ FMD *(-36%)*	seulement chez sujets hypercholestérolémiques ayant ingérés huile d'olive
Nicholls et al.	2006	14 sujets **sains** (8H, 6F ; 18-40 ans)	2 repas mixtes ***(65g de lipides)*** *soit de l'huile de tournesol soit de l'huile de coco*	ND	55 (3h)	FMD et FBF	↘ FMD *(-30%)*	après les 2 repas. Pas d'effet repas
Reueda-Clausen et al.	2007	10 hommes **sains** (18-23 ans)	3 repas mixtes ***(60g lipides)*** *soit de l'huile d'olive, soit huile de palme soit huile de soja*	ND	30 (3h)	FMD	↘ FMD *(-30%)*	après les 3 repas. Pas d'effet repas
Armah et al.	2008	25 hommes **sains** (42-50 ans)	2 repas mixtes ***(43g lipides)*** *soit mélange d'huile de palme et de soja (4:1) soit mélange huiles+ huile d'anchois (6.4g EPA+DHA; 3:1)*	672	72 (4h)	FBF (iontophorèse)	pas de ↘ FBF *après 2 repas*	↗ FBF non-endothélium dépendant après huile de poisson
Berry et al.	2008	17 hommes **sains** (18-50 ans)	2 repas mixtes ***(50g lipides)*** *soit du beurre de karité (stéarates) soit de l'huile de tournesol (oléates)*	714	50 (4h)	FMD	↘ FMD	Effet repas *(-20% pour stéarates et - 40% oléates).*

HTG: hypertriglycéridémie ; E : énergie ; ND : non décrit ; AGS: acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI: acides gras polyinsaturés ;
FMD: Forearm mediated Vasodilatation : FBF ; Forearm blood flow ; DM2 : Diabète de type 2

Tableau 4 : Inflammation à bas bruit et dysfonction endothéliale postprandiale.

Etude	**Année**	**Sujets** *(sexes ; âges)*	**Repas hyperlipidiques** *avec quantités de lipides ajoutés*	**Apport E du repas** (kcal)	**HTG induite** (%) et temps	**Marqueur proinflammatoires**	**Résultats**
Sanders et al.	2001	35 sujets **sains** (17H, 18F; 42-56 ans)	3 Repas mixtes ***(50g lipides)*** *soit de l'huile de Coco (AGS)* *soit de l'huile de tournesol (Oléates)* *soit principalement des stéarates*	ND	70 (3h)	FVIIa,c PAI-1, tPA	↗ FVIIa et FVIIc *(+40%, à 3h)* ↘ PAI-1 *(-40%)*
Tholstrup et al.	2003	16 hommes **sains** (21-28 ans)	6 repas mixtes ***(51%E lipides)*** *avec différents acides gras (stéarates, palmitate, palmitate+myristate, oléates, trans, linoléates)*	1400	140 (4h)	FVIIa,c, PAI-1	↗ FVIIa *(+80%)* et FVIIc *(+500%)* ↗ activité tPA *(+25%)*
Tripathy et al.	2003	18 sujets **sains** (9H, 9F; 28-30 ans)	Charge hyperlipidique *lntralipid à 20%* *ou placebo*	ND	85 (2h)	MCP1, ICAM, TNF-α, MIF, activité NF-κB et PMN	↗ MIF *(+11% à 4h)* ↗ activation NF-κB dans PMN *(+50%, à 2h)*
Van oostrom et al.	2003b	8 hommes **sains** (20-30 ans)	3 tests de charge *soit **50g/m² lipides**;* *soit 37g/m² de glucose* *soit 50g/m² lipides et 37g/m² glucose*	1030	60 (4h)	Leucocytes, IL6, IL8	↗ nb neutrophiles *(+59%)* ↗ IL6 *(+130%)*
Ceriello et al.	2004	20 sujets **sains** (12H, 8F; 50-55 ans) ; 30 sujets **DM2** (22H, 18F, 52-56ans)	2 repas mixtes *soit **75g/m² lipides*** *soit 75 g/m² lipides+75g glucose* *+traitement simvastatine pour les DM2*	1000	110 (2h)	ICAM-1 ; VCAM-1; selectines-E	↗ ICAM, VCAM, selectines-E
Ferreira et al.	2004	18 sujets **sains** (10H, 8F; 22-30 ans)	2 Repas mixtes *soit **19%E lipides*** *soit 0% lipides*	900	80 (3h)	Microparticules	↗ Microparticules *(+70%)*
Van oostrom et al.	2004	10 hommes **sains** (40-55 ans)	Repas hyperlipidique ***50g/m² lipides***	1030	60 (4h)	CD11a,b CD62L, CD66B, Leucocytes	↗ nb leuco surtout neutro *(+40%)*, ↗ CD11b et CD66b sur neutro ↘ CD62L neutro
Neri et al.	2005	46 sujets **sains**, 46 **IR** et 46 **DM2** (23H, 23F;36-45 ans)	Repas mixte ***(80g lipides)*** *avec ou sans 15j de prétraitement antioxydants NAC (600g/j) +Vit E (300g/j) + Vit C (250mg/j)*	1480	50 (2h)	vWF, VCAM-1	↗ vWF *(+7%)* ↗ VCAM *(+15%)*
Blackburn et al.	2006	38 hommes **obèses** (19-62 ans; BMI~30)	Repas mixte ***(64% lipides)***	1800	160 (6h)	IL6, CRP, TNF-α	Pic IL6 à 8H ↘ TNF-α à 4H
Lin et al.	2008	40 hommes **sains** (20-23 ans)	2 repas mixtes ***(50g lipides)*** *avec ou sans 15g arginine*	900	50 (2h)	vWF, sélectine-P	↗ vWF *(+19%)* ↗ sélectines-P *(+30%)*
Rubin et al.	2008	110 hommes **sains** (45-65 ans)	2 tests de charge *soit **52% lipides (dont 65% AGS)*** *soit TOTG (75 g glucose)*	1017	ND	adiponectine	↘ adiponectine *(-5%)*

Tableau 5: Stress oxydant et dysfonction endothéliale postprandiale

Etude	Année	Sujets *(sexes ; âges)*	Repas hyperlipidiques *avec quantités de lipides ajoutés*	Apport E du repas (kcal)	HTG induite (%) et temps	Marqueur de stress oxydant	Résultats
Ceriello et al.	1998	10 sujets **sains** (6H, 4F; 53-55 ans) et 10 sujets **DM2** (6H, 4F: 53-57 ans)	Repas mixte ***30%lipides***	600	ND	TRAP, MDA, Acide Urique, groupements thiols, vitamines E et C	↗ MDA à 3H ↘ groupements thiols et TRAP uniquement pour DM2
Schinkovitz et al.	2000	11 sujets **sains** (5H, 8F; 30-33 ans)	Repas mixte ***90g lipides***	1200	80 (4h)	ORAC, hydroperoxydes plasmatiques	pas d'effet du repas hyperlipidique
Anderson et al.	2001	12 sujets **sains** (5H, 7F; 30-63 ans) et 12 sujets **DM2** (7H, 5F; 35-53 ans)	Repas mixte ***80g AGS***	1480	68 (4h)	Radicaux carbonyles et alkoxyles (par EPR) et TBARS plasmatiques	↗ TBARS *(+77% sains et +28% DM2)* ↗ Radicaux libres *(+37% sains et+97%DM2)*
Bae et al.	2001	20 sujets **sains** (10H, 10F; 44-68 ans)	2 Repas mixtes *soit **53g soit 60% de lipides** soit 3g de lipides et 175g glucides*	803	35 (2h)	Production d'anions superoxydes par les neutrophiles	↗ production d'anions superoxydes à 2H
Tripathy et al.	2003	18 sujets **sains** (9H, 9F; 28-30 ans)	Charge hyperlipidique (*Intralipid à 20%*)	ND	85 (2h)	TBARS plasmatiques + production de ROS par polynucléaires	↗ production de ROS par leucocytes *(+20%)*
Van oostrom et al.	2003	8 sujets **sains** (20-30 ans)	3 tests de charge *soit **50g/m² lipides**; soit 37g/m² de glucose soit 50g/m² lipides et 37g/m² glucose*	1030	60 (4h)	Hydroperoxyde plasmatiques	↗ Hydroperoxydes *(+31% pour lipides et +15% pour charge mixte)*
Tsai et al.	2004	16 hommes **sains** (21-39 ans)	Repas mixte type petit déjeuner ***50g lipides** dont 14g d'AGS*	755	200 (4h)	GSH-Px plasmatique, 8-epiPG urinaires	↘ GSH-px *(à 2h; -10%)* ↗ 8-epiPG urinaire *(à 4h; +20%)*
Tushizen et al.	2006	17 hommes **sains** (20-35 ans)	Repas mixte type petit déjeuner ***50g lipides dont 60% AGS*** *consommation consécutive à 4h d'intervalle*	ND	120 (6h)	MDA, LDLox plasmatiques	↗ LDLox et MDA
Devaraj et al.	2008	11 sujets atteints de **syndrome métabolique** (4H, 7F; 31-67 ans)	2 Repas mixtes type petit déjeuner *soit **50% lipides** soit 9% lipides, 78% glucides et 16%*	915	40 (4h)	ORAC, TBARS, MDA, peroxydes lipidiques plasmatiques	↗ TBARS pour 2 repas *(à 6h; +57% ; effet repas)*; ↗ MDA *(+60%)* ↗ Peroxydes Lip *(+600%)*
Signori et al.	2008	18 sujets **sains** (9H, 9F; 28-30 ans)	Repas mixte ***58% lipides** dont 30% AGS*	1000	120 (4h)	TRAP, SOD plasmatiques	↘ TRAP *(-13%)*
Tyldum et al.	2009	8 hommes **sains** (38-46 ans)	Repas mixte ***78g lipides** précédé 18h avant ingestion d'exercice modéré ou intensif*	911	36 (2-4h)	TRAP plasmatiques	↘ TRAP et ↗ après exercice

Tableau 6 : Effet de supplémentations vitaminiques sur la dysfonction endothéliale postprandiale

Etudes	**Année**	**Sujets** *(sexes, et âges)*	**Repas hyperlipidiques** *avec quantités de lipides ajoutés*	**Apport E du repas** (kcal)	**HTG induite** (%) et temps	**Marqueur de dysfonction endothéliale**	**Résultats**	**Observations**
Bae et al.	2001	10 hommes **sains** (25-27 ans)	3 Repas mixte *soit 53g lipides* ***avec ou sans Vit E (800 UI)*** *soit 3g lipides; 178g glucides*	803	70 (4h)	FMD, MDA	↘ FMD	Effet VitE sur HTG mais pas sur FMD
Blendea et al.	2005	18 sujets **sains** (7H, 11F; 18-24 ans)	2 repas mixtes *(50g lipides)* ***avec ou sans ingestion de Vit C (1g)+ Vit E (800UI)***	740	85 (3h)	compliance vasculaire	↘ compliance	pas d'effet vitamines
Nappo et al.	2002	20 sujets **sains** (10H, 10F; 39-51ans) et 20 sujets **DM2** (10H, 10F; 40-50ans)	2 repas mixtes *soit 59%E lipides* *soit 21% lipides et 73%glucides* ***avec ou sans Vit E (800IU) +Vit C (1g)***	760	60 (4h)	IL6, TNF-α, ICAM, VCAM	↗ IL6, ICAM, VCAM et TNF-α chez témoins et DM2	réduites par ajout de vitamines
Pleiner et al.	2002	10 hommes **sains** (21-27 ans)	Charge hyperlipidique (« intralipid » 20% en IV) ***avec ou sans Vit C (24mg/mL)***	ND	478 (ND)	FBF, vit C plasmatique	↘ FBF ↗ vit C (+583%)	complètement neutralisée par vitC
Plotnick et al.	2003	38 sujets **sains** (14H, 24F, 26-46ans)	Repas mixte 50g lipides ***avec ou sans 3-4sem de supplémentation au jus de fruit ou jus de fruit+extraits de plantes***	900	ND	FMD, Nitrates+nitrites	↘ FMD (-50%)	réduite par jus de fruits et Jus de fruits+extraits de plante
Esposito et al.	2004	25 sujets **sains** (13H, 12F; 23-40ans)	2 repas mixtes *(60% lipides dont 40% AGS)* ***avec ou sans Vit C (180mg) +Vit E (20mg) +fibres***	760	50 (4h)	mesure de pression artérielle après L-arginine et FVIIa, F_{1+2}, PAI1, tPA, agrégation plaquettaire	↘ réactivité vasculaire et activation endothéliale	réduite par ajout de vitamines
Anderson et al.	2001	20 sujets **DM2** (14H, 6F; 36-68ans)	Repas mixte (80g AGS) ***avec ou sans 3 jours de prétraitement à Vit C (1g)***	1480	ND	FMD et Radicaux carbonyles et alkoxyles (par EPR) et TBARS plasmatiques	↘ FMD ↗ TBARS et radicaux	Effet VitC sur FMD et TBARS
Neri et al.	2005	46 sujets **sains**, 46 sujets **IR** et 46 **DM2** (23H, 23F;36-45 ans)	Repas mixtes (*80g lipides*) ***avec ou sans 15j de prétraitement antioxydants*** ***NAC (600g/j)+Vit E(300g/j)+Vit C(250mg/j)***	1480	50 (2h)	vWF, VCAM et MDA, 4-HNE, LDLox, GSH-Px, Nitrates+nitrites, ET-1	Activation endothéliale	Effet de vitamines plus marqué chez sujets DM2 ou IR que chez sujets sains

HTG: hypertriglycéridémie ; E : énergie ; ND : non décrit ; AGS: acides gras saturés ; IR : Insulinorésistant ; FMD: Forearm mediated Vasodilatation : FBF ; Forearm blood flow ; DM2 : Diabète de type 2; NAC: N-acetylcystéine

Tableau 7 : Teneurs en arginine et en cystéine de différentes sources protéiques alimentaires

Source protéique	Arginine [1]	Acides aminés soufrés[1]	Cystéine[1]	Cys/Met
Blé dur	3,4	3,5	2.0	1,3
Riz	7,9	4,2	1,9	0,9
Maïs doux	3,9	2,2	0,8	0,4
Isolé de Soja	7,6	2,5	1.2	0.9
Protéines de Colza	5,9	4,9	2,9	1,4
Amandes	11,0	2,1	1,3	1,5
Viande de bœuf	6,3	3,7	1,1	0,4
Œuf	5,7	5,2	2,2	0,7
Lait	3,5	3,2	0,9	0,4

[1] En g/100 g de protéines

D'après Huneau et al. 2008.

ABSTRACT

Metabolic and pathophysiological characterization of a postprandial model of endothelial dysfunction in rats. Potential benefits of a nutritional amino acids supplementation in prevention of cardiovascular risk

The alteration in vascular endothelial function is the key event in the pathophysiology of atherosclerosis. In healthy humans, a single high-saturated fat/high sucrose meal induces a series of transient vascular, inflammatory and oxidative disturbances that constitute a complex proatherogenic phenotype. However, little is known on early pathways that occur during the postprandial state. Furthermore, some amino acids have been suspected of having an impact on vascular homeostasis, but there is a paucity of information regarding the effect of dietary protein on the initiation of endothelial dysfunction.

We aimed to characterize an animal model of postprandial endothelial dysfunction induced by a high-saturated fat meal (HFM), in healthy rats, in which to delineate the early inflammatory response in adipose tissue, and examine whether the nitric oxide (NO) pathway is impaired in the postprandial setting. Using this model, we have explored whether rapeseed protein, an emergent protein rich in arginine and cysteine may modulate postprandial endothelial dysfunction.

We have clearly characterized a rat model of postprandial endothelial dysfunction, featuring oxidative stress, impairment of the NO pathway and low-grade inflammation. We have revealed that inflammatory pathways are activated very early in the visceral adipose tissue, and the HFM markedly impair basal systemic whole-body NO production.

Interestingly, modulating the protein source of the HFM has a marked protective effect on postprandial endothelial function in healthy rats. Substituting rapeseed protein for milk protein in an HFM totally suppresses postprandial impairment of vascular reactivity and partially decreases postprandial oxidative stress. These results urge on further studies to examine the clinical relevance of specific protein source, in dietary strategies for the prevention of cardiovascular diseases.

Keywords: Vascular endothelial function, postprandial state, nitric oxide, oxidative stress, low-grade inflammation, alimentary protein, rapeseed protein

RESUMÉ

Caractérisation d'un modèle de dysfonction endothéliale postprandiale chez le rat sain : Intérêt de la modulation de la nature des protéines en termes de prévention du risque cardiovasculaire

L'altération de la fonction endothéliale vasculaire est un phénomène précoce et central dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Chez l'homme sain, un repas trop gras et trop sucré induit un ensemble de désordres vasculaires postprandiaux dont les voies de signalisation restent encore méconnues. Par ailleurs, si certains acides aminés participent à l'homéostasie vasculaire, aucune étude n'a examiné les effets d'une modulation de la nature des protéines d'un repas sur les fonctions endothéliales vasculaires.

Afin de préciser l'implication des voies de signalisation du monoxyde d'azote (NO), molécule clé dans l'homéostasie vasculaire, et d'étudier les composantes de la réponse inflammatoire postprandiale, nous avons cherché à caractériser, chez le rat sain, les principaux paramètres de la dysfonction endothéliale induite par un repas riche en acides gras saturés et en saccharose. Nous avons ensuite examiné le potentiel des protéines de colza, naturellement riche en arginine et en cystéine, précurseurs respectifs du NO et du glutathion, à moduler la dysfonction endothéliale postprandiale.

De ce travail de thèse s'est dégagé un solide modèle animal de dysfonction endothéliale postprandiale caractérisée par une diminution de la réactivité vasculaire NO-dépendante, une inflammation à bas bruit et du stress oxydant. Ces évènements postprandiaux délétères étaient associés à une diminution de la production corps-entier du NO et une activation de NF-κB au niveau du tissu adipeux viscéral. Enfin, nous avons montré que les protéines de colza, à des doses nutritionnelles, réduisait le stress oxydant, et prévenait complètement l'altération de la réactivité vasculaire NO-dépendante induits par l'ingestion d'un repas hyperlipidique. Cet effet protecteur des protéines de colza, nous invite à envisager, chez l'homme, la modulation de la nature des protéines d'un repas comme une véritable approche nutritionnelle de prévention du risque cardiovasculaire.

Mots clés : Fonction endothéliale vasculaire, phase postprandiale, monoxyde d'azote, stress oxydant, inflammation à bas bruit, protéines alimentaires, colza.