



HAL
open science

Autofluorescence cutanée des produits de glycation avancée (AGE), mémoire métabolique et complications du diabète

Kalina Rajaobelina

► **To cite this version:**

Kalina Rajaobelina. Autofluorescence cutanée des produits de glycation avancée (AGE), mémoire métabolique et complications du diabète. Santé publique et épidémiologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0256 . tel-01508484

HAL Id: tel-01508484

<https://theses.hal.science/tel-01508484>

Submitted on 14 Apr 2017

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.

Année 2016

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE : Sociétés, Politique, Santé publique
SPECIALITE : Santé publique, OPTION : Epidémiologie

Par Kalina RAJAABELINA
Née le 27 janvier 1990 à Madagascar

**Autofluorescence cutanée
des produits de glycation avancée (AGE),
mémoire métabolique et complications du diabète**

Sous la direction de : **Pr Vincent Rigalleau**

Soutenue le 22 décembre 2016

Membres du jury :

Pascal BARAT	PU-PH, Bordeaux, France	Président
Marie-Aline CHARLES	DR Inserm, Villejuif, France	Rapporteur
Samy HADJADJ	PU-PH, Poitiers, France	Rapporteur
Bernard JEGOU	DR Irset-Inserm, Rennes, France	Membre invité
Vincent RIGALLEAU	PU-PH, Bordeaux, France	Directeur de Thèse

RESUME

Dans un contexte de vieillissement de la population et d'accroissement des maladies chroniques liées à l'âge comme le diabète, de nouveaux biomarqueurs de l'état de santé à long terme doivent être étudiés. Les produits de glycation avancée (AGE) sont des molécules témoins de la charge métabolique accumulée au cours du temps, dénommée "mémoire métabolique". Les AGE jouent un rôle important dans les lésions à long terme dans le diabète et dans le déclin du métabolisme global lié au vieillissement. L'accumulation cutanée des AGE peut être mesurée par autofluorescence (AF) de manière instantanée et non invasive grâce à l'AGE-READER. Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer la valeur de l'AF cutanée des AGE en tant que marqueur de mémoire métabolique chez des personnes âgées de la cohorte des 3-Cités et parallèlement d'évaluer la valeur pronostique de l'AF pour les complications du diabète chez des patients porteurs de diabète de type 1. Chez les personnes âgées, nous avons montré que l'AF reflétait les statuts glycémique et rénal 10 ans avant la mesure. Chez les patients atteints de diabète de type 1, l'AF était associée à la présence d'une neuropathie 4 ans plus tard. De plus, dans cette même population, nous avons décrit l'évolution de l'AF sur 4 ans de suivi. Nous avons montré que les principaux déterminants de son évolution étaient la fonction rénale et le traitement par pompe à insuline. Enfin nous avons trouvé que l'augmentation de l'AF sur 4 ans de suivi était associée à la survenue de la maladie rénale. Ces travaux soulèvent de nouvelles perspectives de recherche quant à l'intérêt de l'AF à différents âges clés de la vie en tant que biomarqueur de pathologies qui évoluent sur des dizaines d'années.

Mots clés : Produits de glycation avancée, autofluorescence cutanée, mémoire métabolique, vieillissement, diabète, maladie rénale.

ABSTRACT

In the context of the ageing of the population and the increase of age related diseases such as diabetes, new biomarkers of the long-term health status should be considered. Advanced glycation end products (AGE) are molecules indicators of the metabolic burden over time, called “metabolic memory”. AGE play an important role in long term diabetes injuries and in the global decline of the metabolism related to ageing. Skin accumulation of AGE can be measured by autofluorescence instantly and non-invasively with a tool called AGE-READER. The objectives of my dissertation were to evaluate the value of the skin autofluorescence (sAF) of AGE as marker of metabolic memory in elderly people from the 3-City cohort and in parallel, in patients with type 1 diabetes, evaluate the prognostic value of sAF for diabetes complications. In the elderly population, we showed that sAF reflected glycemic and renal status of 10 years before. In patients with type 1 diabetes, sAF was associated to the presence of neuropathy 4 years later. Moreover, in this same population, we described the evolution of sAF in 4 years of follow-up and we showed that the principal determinants of the evolution of sAF were kidney function and insulin pump therapy. Finally, we also found that increase of sAF in 4 years was associated with the occurrence of kidney disease. This work rises new research opportunities about the interest of sAF at different key ages as biomarker of pathologies which evolve in several decades.

Keywords : Advanced glycation end product, skin autofluorescence, metabolic memory, aging, diabetes, kidney disease

UNITE DE RECHERCHE

Equipe Exposition vie entière, santé, vieillissement – LEHA, Centre de recherche INSERM U1219, Université de Bordeaux, ISPED, 146 rue Léo-Saignat 33076 BORDEAUX cedex

Thèse préparée dans le cadre du Réseau doctoral en santé publique animé par l’EHESP.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE LIEE A LA THESE

Articles publiés :

Maury E, Savel J, Grouthier V, **Rajaobelina K**, Corvo L, Lorrain S, Gonzalez C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Is skin autofluorescence a marker of metabolic memory in pregnant women with diabetes? *Diabet Med*. 2015 Dec;32(12):1575-9.

Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products: Marker of Metabolic Memory in Elderly Population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015 Jul;70(7):841-6.

Rajaobelina K, Farges B, Nov S, Maury E, Cephise-Velayoudom FL, Gin H, Helmer C, Rigalleau V. Skin autofluorescence and peripheral neuropathy four years later in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016 May 27.

Vélayoudom-Céphise FL, **Rajaobelina K**, Helmer C, Nov S, Pupier E, Blanco L, Hugo M, Farges B, Astrugue C, Gin H, Rigalleau V. Skin autofluorescence predicts cardio-renal outcome in type 1 diabetes: a longitudinal study. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Sep 1;15(1):127.

Bentata R, Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Delcourt C, Blanco L, Pupier E, Rougier MB, **Rajaobelina K**, Hugo M, Korobelnik JF, Rigalleau V. Skin autofluorescence, renal insufficiency and retinopathy in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* (In press)

Article soumis:

Rajaobelina K, Helmer C, Vélayoudom-Céphise FL, Nov S, Farges B, Pupier E, Blanco L, Hugo M, Gin H, Rigalleau V. Progression of skin autofluorescence of AGEs over 4 years in patients with type 1 diabetes.
Soumis à *Metabolism*.

Articles en préparation :

Rajaobelina K, Féart C, Helmer C, Cougnard-Gregoire A, Merle B, Delcourt C, Samieri C, Rigalleau V. Adherence to a Mediterranean diet and Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products in older persons: the Three-City study

Pilleron S, **Rajaobelina K**, Tabue-Teguo M, Dartigues J-F, Helmer C, Delcourt C, Rigalleau V, Féart C. Accumulation of glycation end products evaluated by skin autofluorescence and incident frailty in older adults from the Bordeaux 3-City Cohort.

Communications dans les congrès:

Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. L'autofluorescence des produits de glycation avancés cutanés marqueur de mémoire métabolique chez les personnes âgées. *Congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD)* 11-14 Mars 2014, Paris, France. Résumé publié : *Diabetes&Metabolism* 2014;40(1). (Poster)

Rajaobelina K, Farges B, Nov S, Maury E, Gonzalez C, Gin H, Barberger-Gateau P, Helmer C, Rigalleau V. Skin Autofluorescence of Advanced Glycation End Products Predicts Peripheral Neuropathy 4 Years Later in Type 1 Diabetes. *American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions*. juin 2015, Boston (Poster commenté)

Rajaobelina K, Helmer C, Nov S, Farges B, Maury E, Gonzales C, Farges B, Gin H, Rigalleau V. Determinants of Change of sAF over 4 Years of Follow-up in Type 1 Diabetes. *American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions*. juin 2015, Boston (Poster)

Velayoudom-Cephise FL, **Rajaobelina K**, Maury E, Gonzalez C, Farges B, Gin H, Rigalleau V. L'autofluorescence cutanée est associée à la macroangiopathie indépendamment de la présence d'une maladie rénale chronique au cours du diabète de type 1. 2015 Mar. *Congrès de la Société Francophone de diabétologie*, 24-27 mars 2015, Bordeaux Résumé publié : *Diabetes&Metabolism* 2015;41(1). (Oral)

Rajaobelina K, Féart C, Helmer C, Cougnard-Gregoire A, Merle B, Delcourt C, Samieri C, Rigalleau V. Adherence to a Mediterranean diet and Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products in older persons: the Three-City study. *52nd European Association for the Study of Diabetes*, 12-16 septembre 2016, Munich. (Poster)

Pilleron S, Tabue-Teguo M, **Rajaobelina K**, Dartigues JF, Helmer C, Delcourt C, Rigalleau V, Féart C. Accumulation des produits de glycation avancée et fragilité chez les personnes âgées : résultats de la cohorte Trois-Cités Bordeaux. *4^{ème} congrès francophone fragilité des personnes âgées et prévention de la perte d'autonomie*, 17-18 mars 2016, Toulouse, France. Résumé publié: *L'année gériatrique* 2016;30, Tome I :22. (Oral)

AUTRES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUE

Communications dans les congrès:

Rajaobelina K, Maillard P, Barberger-Gateau P, Samieri C. Hypercholestérolémie et atrophie du lobe médio-temporal à l'imagerie par résonance magnétique chez le sujet âgé. *Congrès de l'Association Des Epidémiologistes de Langue Française (ADELF)*, 17-19 Oct 2013, Bordeaux, France. Résumé publié: *Rev Epidemiol Sante Publique* 2013;61(4) (Oral)

Monlun M, Rigalleau V, **Rajaobelina K**, Hugo M, Blanco L. Mesure de vitesse de conduction nerveuse au lit du patient par DPN Check : influence de la glycémie. *33^e*

Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 5-8 octobre 2016, Bordeaux, France (Poster).

Article en préparation :

Lapeyre G, Cougnard-Grégoire A, Noëlle Delyfer M, Cécile Delcourt C, Hadjadj S, Blanco L, Pupier E, Rougier MB, **Rajaobelina K**, Mohammedi K, Hugo M, Korobelnik JF, Rigalleau V. A parental history of diabetes is associated with a high risk of retinopathy in patients with type 2 diabetes.

Organisation de séminaire :

1er Séminaire interdisciplinaire du Réseau Doctoral de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique «**Diabetes and obesity, current understanding and perspectives for 2030**», 23 janvier 2015, ISPED, Bordeaux.

Financements: Réseau doctoral de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, SFR Santé publique

Comité organisateur: **Rajaobelina K**, Krol A, Stüwe L, Jesson J, Brondeel R

Programme:[http://www.ehesp.fr/wp-](http://www.ehesp.fr/wp-content/uploads/2011/01/Seminar_DiabetesAndObesity_program.pdf)

[content/uploads/2011/01/Seminar_DiabetesAndObesity_program.pdf](http://www.ehesp.fr/wp-content/uploads/2011/01/Seminar_DiabetesAndObesity_program.pdf)

Présentations:www.youtube.com/watch?v=XqmDLRI_ZGk&list=PLXFjmauiTA-fz8cHkrVfjzfMoOX8oSQ09

REMERCIEMENTS

A Vincent Rigalleau, mon directeur de thèse, je vous remercie de m'avoir donné la chance de vivre cette aventure de 3 ans que représente la thèse. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci de m'avoir enseigné la recherche, d'avoir encadré mes travaux et partagé votre expérience avec tant de passion. Merci pour votre disponibilité, votre confiance et votre soutien tout au long de ma thèse.

Pascale Barberger-Gateau, je vous remercie de m'avoir accueillie dans l'équipe, conseillée, soutenue et de m'avoir enseigné l'épidémiologie avec tant d'enthousiasme et d'excellence.

Je remercie le jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et de faire le déplacement à Bordeaux à l'occasion de la soutenance.

A mes professeurs de l'ISPED, je leur témoigne ma reconnaissance pour m'avoir donné la chance de découvrir l'ISPED et enseigné la Santé publique. Merci à Marthe-Aline Jutand, Rodolphe Thiebaut et Marianne Saves de m'avoir guidée au cours de mon Master.

A toute l'équipe LEHA, je vous remercie chaleureusement pour votre accueil.

Catherine, merci de m'avoir fait découvrir, enseigné et encadrée dans la recherche épidémiologique avec tant d'enthousiasme. Merci pour ton écoute, pour tous tes conseils et ta disponibilité ces 5 dernières années.

Cécilia, je te remercie très chaleureusement pour tout ce que tu m'as appris depuis mon stage de M2. Merci d'avoir partagé ton expérience avec tant d'enthousiasme, de rigueur et de passion. Merci pour tous tes conseils, ton écoute et ta disponibilité.

Cécile, je te remercie pour tous tes conseils, ton écoute, ta disponibilité ainsi que ton soutien.

Audrey, un grand merci pour ton aide, ton écoute, tes conseils au cours de ma thèse.

Bénédicte, merci pour tes conseils qui m'ont été d'une très grande utilité au cours de ma thèse et dans le futur.

Soufiane, merci pour tes conseils stat et tous les bons moments de rigolade !

J'adresse également mes remerciements à tous mes amis, les Sarahs, Laura, Nasta, Adri, les Beglais (la famille wannaahh) et tous les autres qui ont été là pour me soutenir et m'encourager tout au long de mes études et dans les moments les plus durs. Merci les copains pour tous les beaux moments de détente et de rigolade partagés ;-).

Les parisiens, merci de m'avoir hébergée au cours de cette thèse.

Clem et Imen, merci pour votre aide en anglais ;-).

Adri, merci pour ton aide et ta patience... ;-p en informatique.

Mélanie, merci pour tous tes conseils, les pauses café, les pauses escalade et ton écoute au cours de cette thèse.

Julie, merci pour tous ces bons moments de rigolade passés ensemble au cours de cette thèse, merci pour ta gentillesse, ton écoute et tes chansons anti-stress ;-).

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à mes parents, mon frère, ma famille pour son soutien. Dada sy Neny, merci pour votre soutien inconditionnel tout au long de ces années d'études et tout au long de ma vie. Tsiory, merci pour ton soutien et ces beaux moments de rigolade passés avec toi. Vita iany ilay fianara !!! Fiouuuu. Inona ilay manaraka ?

SOMMAIRE

INTRODUCTION	13
1 PARTIE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES	15
1.1 Métabolisme des AGE.....	15
1.1.1 Mécanisme moléculaire de formation des AGE	15
1.1.2 Sources d'AGE	18
1.1.3 Elimination rénale des AGE.....	21
1.2 Mémoire métabolique.....	22
1.2.1 Etudes supportant le concept de mémoire métabolique	22
1.2.2 Bases moléculaires de la mémoire métabolique : stress oxydant et AGE.....	25
1.3 AGE et complications du diabète	28
1.3.1 Complications microvasculaires	28
1.3.2 Complications macrovasculaires.....	30
1.4 AGE et vieillissement.....	32
1.5 Autofluorescence cutanée des AGE	35
1.6 Objectifs de la thèse.....	36
2 PARTIE 2 : METHODES	37
2.1 Présentation de la cohorte des 3-Cités	37
2.2 Recueil des données.....	38
2.2.1 A l'inclusion.....	38
2.2.2 Aux suivis.....	39
2.3 Variables d'intérêt	39
2.3.1 Mesure de l'Autofluorescence cutanée	39
2.3.2 Durée du diabète et durée de la maladie rénale chronique.....	39
2.3.3 Variables d'ajustement	40
2.4 Présentation de la cohorte de patients ayant un diabète de type 1	41

2.5	Recueil des données.....	41
2.5.1	A l'inclusion.....	41
2.5.2	A 4 ans de suivi.....	42
3	PARTIE 3 : RESULTATS.....	43
3.1	L'autofluorescence cutanée des AGE : marqueur de mémoire métabolique chez les personnes âgées en population générale (article 1)	43
3.1.1	Introduction	43
3.1.2	Discussion	44
3.2	Autofluorescence cutanée et neuropathie périphérique 4 ans plus tard chez des patients atteint d'un diabète de type 1 (Article 2).....	51
3.2.1	Introduction	51
3.2.2	Discussion	52
3.3	Progression de l'autofluorescence des AGE sur 4 ans de suivi chez des patients atteint d'un diabète de type 1 (article 3, en soumission)	62
3.3.1	Introduction	62
3.3.2	Discussion	63
4	PARTIE 4 : DISCUSSION.....	79
4.1	Résultats principaux et mise en perspective avec la littérature	79
4.2	Prévention et inhibiteurs de l'accumulation des AGE.....	84
4.3	Perspectives de recherche	86
4.4	Interdisciplinarité et perspectives de santé publique	90
4.5	Conclusion.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique de différents AGE

Figure 2. Etape de formation des AGE

Figure 3. Formation et métabolisme des composés carbonylés réactifs

Figure 4. Les études DCCT-EDIC montrent que la prédisposition à développer des complications diabétiques est maintenue longtemps après le passage d'un faible contrôle glycémique à un contrôle glycémique intensif

Figure 5. Mécanisme moléculaire des complications du diabète

Figure 6. Accumulation des AGEs au cours du temps

Figure 7. Modèle conceptuel des effets des AGE au cours du vieillissement

Figure 8. Fonctionnement de l'AGE READER

Figure 9. Schéma d'étude de la Cohorte des 3-Cités

Figure 10. Schéma d'étude de la cohorte de diabétiques de type 1

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AF** : Autofluorescence
- AGE** : Advanced glycation end products
- CEL** : N(Carboxyethyl)lysine
- CHU** : Centre Hospitalo-Universitaire
- CML** : Carboxymethyllysine
- DCCT** : Diabetes Complication and Control Trial
- DFG** : Débit de filtration glomérulaire
- DG** : Diabète Gestationnel
- EDIC** : Epidemiology of Diabetes Intervention and Complication trial
- HDL** : High Density Lipoprotein
- HGPO** : Hyperglycémie Provoquée Orale
- HOMA** : Homeostasis Model Assessment
- HR** : Hazard Ratio
- HTA** : Hypertension Artérielle
- LDL** : Low Density Lipoprotein
- MeDi** : Mediterranean Diet
- NF- κ B** : Nuclear Factor κ B
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- OR** : Odds Ratio
- RAGE** : Récepteur spécifique des AGE
- Score DN4** : Score de Douleur Neuropathique en 4 questions
- UA** : Unité Arbitraire
- UKPDS** : United Kingdom Prospective Diabetes Study
- 3C** : Cohorte des 3 Cités

INTRODUCTION

A mesure que l'espérance de vie augmente, nous sommes confrontés à de nouveaux enjeux de santé comme le vieillissement et l'accroissement des maladies chroniques liées à l'âge. Parmi ces dernières, le diabète représente actuellement une épidémie mondiale. Le diabète est défini par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme un état d'hyperglycémie chronique exposant à des complications chroniques à long-terme (1). Cette maladie représente un fardeau financier pour les patients, leur famille et les systèmes de santé. Il s'agit en effet d'une maladie chronique, avec une utilisation accrue des services de santé, qui entraîne la perte de productivité à long terme du fait de ses complications. La majorité des pays consacre 5 à 20 % de leurs dépenses totales de santé au diabète (2). Le vieillissement de la population et l'augmentation du nombre de personnes en surpoids sont des facteurs importants ayant une incidence sur la prévalence du diabète à l'échelle mondiale (3). En 2015, 415 millions d'adultes étaient porteurs du diabète dans le monde et la prévalence du diabète devrait augmenter d'ici 2040 pour atteindre 642 millions d'adultes selon la Fédération Internationale du Diabète (2).

Dans cette thèse j'ai étudié parallèlement une population atteinte de diabète de type 1 et une population âgée. En effet, ces deux conditions partagent des similitudes physiologiques et pathologiques. Les maladies liées à l'âge touchent les mêmes organes que les complications du diabète. Dans le contexte actuel où le vieillissement en bonne santé est aussi un enjeu de Santé publique (4), de nouvelles stratégies de prise en charge, de recherche et de nouveaux biomarqueurs doivent être étudiés.

Nous avons porté une attention particulière sur des molécules impliquées dans le mécanisme physiopathologique du diabète et du vieillissement : les produits de glycation avancée (AGE). Ces molécules sont issues de la fixation d'un sucre sur une protéine, un acide aminé ou un lipide.

Il existe des facteurs d'accumulation exogènes des AGE comme la nourriture ou le tabac (5). Au niveau endogène l'accumulation des AGE augmente avec l'âge, avec l'hyperglycémie où les AGE sont produits en excès, et lors de la maladie rénale où le défaut de clairance des AGE et de ses précurseurs favorise leur accumulation. Ces molécules toxiques s'accumulent dans tous les organes. Les lésions qui en résultent participent au mécanisme des complications du diabète, mais aussi au déclin multi-organes avec le vieillissement. Différents travaux dont

notre étude en population générale chez les personnes âgées montrent que les effets de cette accumulation des AGE pourraient persister à long terme. Ce phénomène clé, appelé mémoire métabolique joue un rôle important dans les complications du diabète.

Certains AGE ont une propriété d'autofluorescence que nous mesurons de manière originale et non-invasive au niveau de la peau pour estimer l'accumulation des AGE ; cette mesure pourrait être d'un grand intérêt en pratique clinique et en recherche épidémiologique.

Dans une première partie, je présenterai le métabolisme des AGE, leur rôle dans la mémoire métabolique, dans les complications du diabète et dans le vieillissement et enfin, la méthode de mesure des AGE par autofluorescence cutanée. Dans la deuxième partie, je présenterai les deux cohortes sur lesquelles s'appuient mes travaux de thèse, ainsi que les variables utilisées dans mes travaux. Dans une troisième partie je présenterai les résultats de mes travaux sous forme d'articles. Finalement, dans une quatrième et dernière partie, je discuterai mes résultats et je conclurai.

1 PARTIE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES

1.1 Métabolisme des AGE

1.1.1 Mécanisme moléculaire de formation des AGE

Les AGE sont des molécules toxiques pour l'organisme et leur accumulation a été montrée dans une grande variété de tissus comme le cortex rénal, les plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (6), le cartilage dans la polyarthrite rhumatoïde (7), le système cardiovasculaire (8), le foie (9), les yeux (10) et la peau (11). Il est maintenant admis que la production d'AGE dans le corps est un processus inévitable et continu tout au long de la vie (12). Leur accumulation joue un rôle important dans le vieillissement (13) et dans les complications du diabète (14).

Les AGE sont des molécules complexes et hétérogènes (figure 1) issues de la réaction de glycation. Parmi les AGE à ce jour caractérisés in-vivo et dans l'alimentation, les plus connus sont notamment la carboxyméthylllysine (CML), la pentosidine ou la N(Carboxyethyl)lysine (CEL) (15).

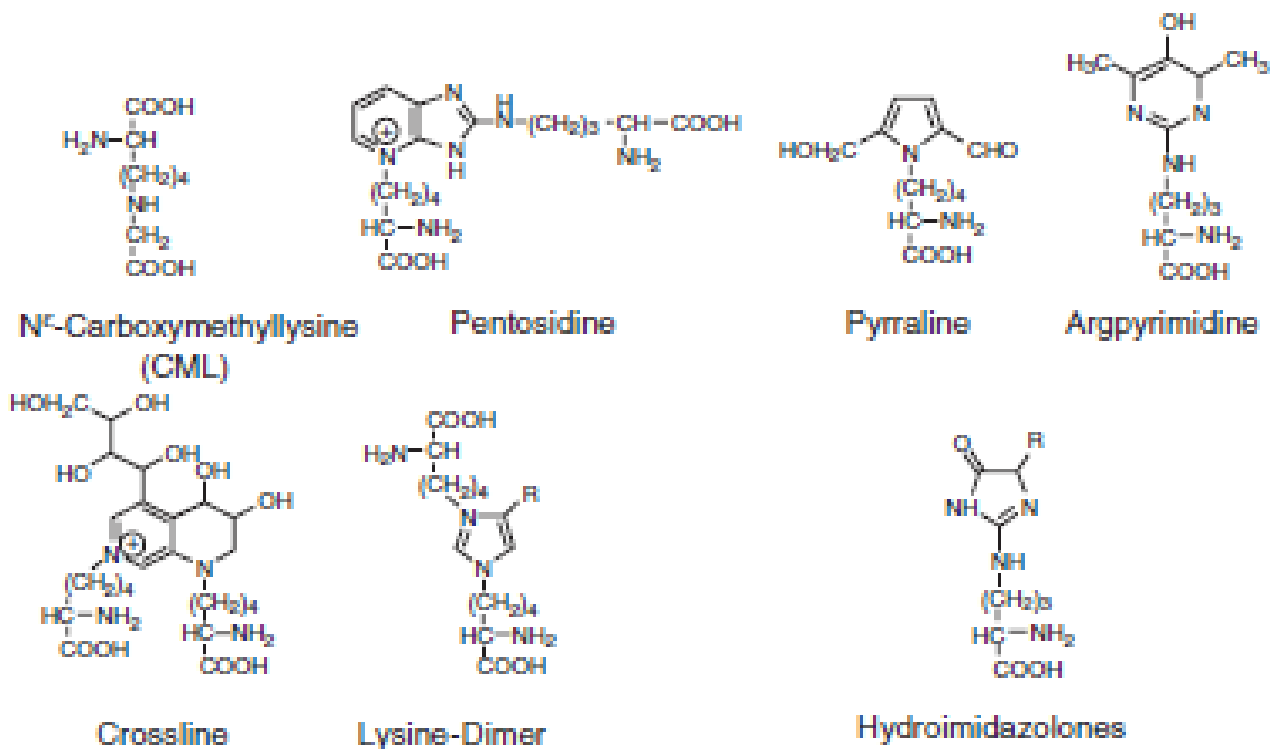


Figure 1. Structure chimique de différents AGE (12)

La réaction de glycation, aussi appelée réaction de Maillard a été découverte en 1912 par Louis Camille Maillard. Bien que la biochimie des AGE soit connue depuis leur découverte, c'est dans les années 1960 que cette réaction a été observée in vivo dans le corps humain grâce à la formation de l'hémoglobine glyquée (un précurseur des AGE) chez des patients diabétiques. Ces 20 dernières années d'importants travaux ont été réalisés sur les AGE (5,16).

La réaction de glycation nécessite plusieurs étapes de réarrangement avant d'aboutir à des composés très stables que sont les AGE. Caractérisés par la propriété d'autofluorescence de certains d'entre eux ou par leur couleur brune dans certains aliments comme la bière ou la croûte du pain, les AGE sont le résultat de la modification d'une protéine, d'un acide nucléique ou d'un lipide par des sucres réduits au niveau de leur groupement amino terminal (12). La glycation est irréversible et non-enzymatique (5). La réaction de glycation est composée de trois grandes étapes (figure 2) : la phase initiale, la propagation et la phase avancée.

La phase initiale est dépendante de la concentration en sucre, c'est pourquoi elle est augmentée chez les personnes ayant une hyperglycémie chronique au cours du diabète. Dans cette phase, un sucre réduit comme le glucose, le fructose ou le ribose réagit avec le groupement amino terminal d'une protéine, d'un acide nucléique ou d'un lipide formant une base de Schiff instable. La base de Schiff subit ensuite un réarrangement structurel pour donner des produits plus stables que sont les produits d'Amadori (17,18).

Au cours de la phase de propagation, la réorganisation des produits d'Amadori conduit à des produits intermédiaires hautement réactifs ; ce sont des composés carbonylés, précurseurs des AGE: Glyoxal, méthylglyoxal et 3-Deoxyglucosone (19,20).

Enfin, au cours de la phase avancée, les composés carbonylés subissent une série d'oxydation, de clivage et de pontage puis réagissent avec les résidus arginine et lysine des protéines pour donner des produits irréversibles, complexes, très stables et résistants à la digestion protéolytique : ce sont les AGE (5,17,21).

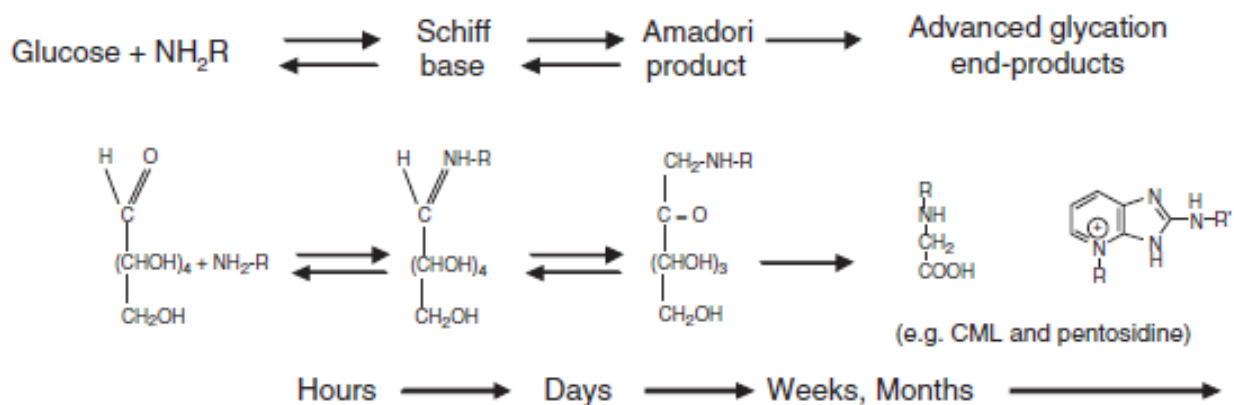


Figure 2. Etape de formation des AGE (12)

Néanmoins, en plus des étapes classiques de formation des AGE, les précurseurs des AGE que sont les composés carbonylés (Glyoxal, méthylglyoxal et 3-Deoxyglucosone) peuvent aussi être générés à chaque étape de la réaction de glycation par des réactions chimiques annexes. Par exemple, une base de Schiff peut subir une oxydation pour former ces composés carbonylés. Les précurseurs des AGE peuvent aussi provenir de l'auto-oxydation du sucre ou de la peroxydation des lipides (12,22).

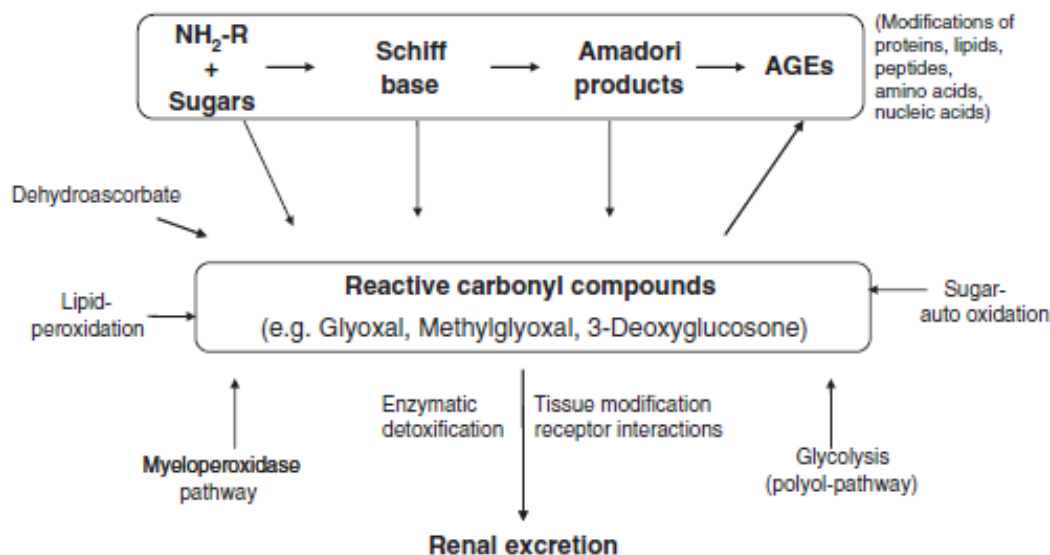


Figure 3. Formation et métabolisme des composés carbonylés réactifs (12)

La glycation est une réaction lente, le stade avancé de la glycation survient sur une période de quelques semaines. De ce fait, les protéines ayant une longue demie-vie et donc un turn-over

lent comme le collagène ou l'élastine sont les plus sensibles aux modifications par les AGE (23–26). Ces protéines ont la particularité de constituer les matrices et les protéines de structure dans les tissus (12). La réaction de glycation est accélérée avec le processus de vieillissement mais elle l'est d'autant plus dans des conditions d'hyperglycémie, d'inflammation et de stress oxydant (13).

Dans le diabète, une hypothèse cherchant à unifier les voies menant de l'hyperglycémie aux complications du diabète, le principal lien est le stress oxydant, c'est-à-dire la production d'ions superoxydes par les mitochondries. Le stress oxydant serait un mécanisme clé activateur des différentes voies menant aux complications diabétiques. Une de ces voies est la formation des AGE qui est augmentée par le stress oxydant (12,27,28). Le stress oxydant joue un rôle important au cours de la glycation car la plupart des étapes de la glycation s'accompagnent d'un stress oxydant. Il a été montré que les modifications induites par la glycation et le stress oxydant sont comparables (21,29,30).

Les trois principaux processus par lesquels les AGE induisent des dommages sont la liaison à leur récepteur spécifique (RAGE), la formation de croisements covalents entre les protéines lors de la formation des AGE et la modification des matrices extracellulaires. D'une part, la liaison des AGE à leurs récepteurs RAGE active le stress oxydant et l'inflammation, de ce fait les AGE sont des molécules fortement pro-oxydantes (26). D'autre part, il y a la modification des protéines lors de la formation des AGE, ce qui peut conduire à la formation de croisements covalents entre les protéines (5,31) et à l'altération de leur structure et donc de leur fonction dans tout l'organisme (32).

1.1.2 Sources d'AGE

Les AGE peuvent se former dans l'organisme mais peuvent aussi provenir de sources environnementales.

1.1.2.1 Production endogène d'AGE

Age

Le vieillissement est caractérisé par le déclin de l'intégrité anatomique et fonctionnelle du corps qui se traduit par une diminution de la capacité à répondre au stress. Des études ont montré que la détérioration des fonctions mitochondriales entraîne l'augmentation du stress

oxydant et l'inflammation avec l'âge (33). L'accumulation de dommages macromoléculaires comme la formation de réactifs oxygénés et de radicaux libres impliqués dans le stress oxydant est l'un des principaux processus qui contribuent au vieillissement et à l'apparition de maladies liées à l'âge (30,34,35). Même en l'absence de maladie, le niveau d'AGE augmente avec l'âge (30,36,37). En effet, il a été montré que le vieillissement est associé à des taux élevés de formation et d'accumulation des AGE (38). L'accumulation des AGE liée à l'âge a été montrée dans le cartilage et dans la peau (39,40). L'âge de cadavres humains a pu être estimé par la mesure des AGE dans l'hippocampe (41). Enfin, le niveau d'AGE est un prédicteur du décès chez la souris (37,42).

Diabète

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1.1.1, la première étape de la réaction de glycation est dépendante de la concentration en glucose. L'état d'hyperglycémie chronique au cours d'un diabète entraîne donc l'accélération de l'accumulation des AGE (14).

1.1.2.2 Source environnementale d'AGE

Nutrition

L'étude de la teneur en AGE et des modes de préparation des aliments a permis d'identifier des groupes d'aliments riches en AGE ainsi que des modes de cuisson favorisant leur formation. A l'état brut, les aliments les plus riches en graisses et en protéines sont aussi les plus riches en AGE (CML et méthylglyoxal). La viande est l'aliment le plus riche, probablement du fait de la présence d'amino-lipides hautement réactifs et de sucres réduits. Au contraire, les aliments riches en glucides, ayant une plus forte teneur en eau, en sucres non réduits et en antioxydants comme les légumes, les fruits et le lait frais contiennent le moins d'AGE (43,44). Cependant, la formation de nouveaux AGE dans les aliments augmente avec la température de transformation. Les modes de cuisson à haute température les plus favorisant sont la friture (180-230°C), les grillades (225°C) et le rôtissage (177°). Parmi les aliments transformés à ce jour identifiés comme les plus riches en AGE (CML), on retrouve la viande grillée (43-46). La teneur en AGE peut être fortement augmentée au cours de la cuisson de certains aliments habituellement identifiés comme "sains". Les plus riches en AGE parmi les aliments à base de céréales raffinées sont le pain grillé, certaines céréales de petits déjeuner et les biscuits (43-45). Parmi les produits laitiers les plus riches en AGE, on retrouve par exemple le lait en poudre pour enfant pouvant contenir jusqu'à 70 fois plus d'AGE que le

lait maternel (43,44,47). Des temps de cuisson plus courts, des températures plus basses, un degré d'humidité plus élevé et l'utilisation de condiments acides ont été identifiés comme des facteurs limitant la formation des AGE. La transition nutritionnelle des 50 dernières années est caractérisée par la consommation d'une large variété d'aliments fortement transformés pour des raisons d'hygiène, et culinaires (apparence, saveur, couleur) (44). Ce changement favorise probablement l'exposition aux AGE alimentaires, d'autant plus qu'ils sont partiellement absorbés. Après un seul repas riche en AGE, il a été estimé qu'environ 10% des AGE sont absorbés dont deux tiers retenus dans les tissus (48). Ainsi, une alimentation riche en AGE pourrait contribuer à augmenter le risque de développer des maladies cardiovasculaires et chroniques (y compris le diabète), et accélérer le déclin multi-fonctionnel lié à l'âge (13). En effet, ces 15 dernières années, un nombre croissant d'études (49) a montré qu'une alimentation favorisant l'apport en AGE, ou un seul repas riche en AGE pourraient accélérer le stress oxydant, l'inflammation, le dysfonctionnement endothélial et la perturbation du métabolisme dès la période post prandiale, chez des individus atteints de diabète (50), mais aussi chez des individus non diabétiques. Le diabète de type 2 est initié par une résistance à l'insuline. Avant l'apparition d'un diabète de type 2, des études suggèrent que les AGE alimentaires pourraient être impliqués dans la résistance à l'insuline (51–53). De manière intéressante, dans une étude d'intervention chez des femmes en surpoids, une alimentation pauvre en AGE a été associée à la diminution de la résistance à l'insuline (53).

Tabac

Il existe très peu d'études sur le tabac et les AGE mais certaines ont montré que le tabac peut aussi être une source exogène d'AGE (54,55). Des AGE dérivés du tabac ont pu être observés sur le cristallin et sur les parois artérielles (54). Peu de travaux ont été réalisés sur le mécanisme de formation des AGE issus du tabac, et à ce jour, ces types d'AGE ne sont pas encore très bien caractérisés (55).

Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est un état d'intolérance au glucose apparu ou reconnu au cours de la grossesse et concerne au moins 6% des grossesses (56). Il a été montré que les AGE pourraient avoir une implication directe dans certaines complications obstétricales. Ainsi, certains AGE (CML, méthylglyoxal) sont détectables dès la naissance dans le sang du cordon et leurs concentrations ont été corrélées à celles du sang maternel, et ce, même chez des femmes enceintes indemnes de diabète gestationnel (57). Ceci suggère une transmission

materno-foetale de ces AGE. L'exposition foetale aux AGE générée par cet état d'hyperglycémie pourrait avoir des conséquences importantes sur l'enfant. Des taux de méthylglyoxal maternels élevés ont été associés à une insulino-résistance plus élevée un an plus tard chez l'enfant et à un défaut de fermeture du tube neural (58). Des taux anormaux du récepteur soluble RAGE des AGE ont aussi été rapportés chez les mères d'enfants prématurés (59) et chez les enfants prématurés en lien avec la pré-éclampsie maternelle (60). Les effets pro-inflammatoires de la liaison des AGE aux RAGE, fortement exprimés au niveau du placenta, contribuent probablement aux anomalies vasculaires de la pré-éclampsie (61).

1.1.3 Elimination rénale des AGE

Les reins jouent un rôle clé dans le métabolisme des AGE car ils permettent leur clairance. Le tubule proximal a été identifié comme étant le site de catabolisme des AGE (62) et l'accumulation des AGE est indépendamment associée au débit de filtration glomérulaire (63). Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, les taux d'AGE sont élevés d'autant plus en phase terminale (64,65) où les patients hémodialysés ont un taux plasmatique d'AGE 40 fois plus élevé (66). Le défaut d'élimination des AGE et l'augmentation de leur concentration sont aussi fortement impliqués dans les complications rénales. Les AGE sont associés à des changements structuraux au niveau des reins et ont été associés à la progression de la maladie rénale chronique. Toutes les structures rénales sont sensibles à l'accumulation des AGE : les membranes basales, les cellules mésangiales et endothéliales ainsi que les podocytes et les tubules (67,68). La progression de la maladie rénale accompagnée d'un stress oxydant et d'un turn over ralenti des protéines participerait à l'augmentation de la formation et de l'accumulation des AGE. Il en résulte un cercle vicieux entre lésions rénales, diminution de la clairance des AGE et augmentation de leur accumulation qui elle-même conduit à l'aggravation des lésions rénales (69). Par ailleurs, la fonction rénale diminue progressivement avec l'âge, contribuant aussi à l'augmentation de l'accumulation des AGE avec l'âge.

1.2 Mémoire métabolique

En diabétologie, les recherches concernant les complications liées au diabète ont permis de mettre en évidence un phénomène clé, impliquant l'accumulation des AGE : « la mémoire métabolique ». La mémoire métabolique est définie comme les effets à long terme d'un statut glycémique initial sur le développement et la progression des complications vasculaires. Le concept de mémoire métabolique suggère le besoin d'un traitement agressif précoce pour contrôler les complications du diabète (70). L'hypothèse moléculaire sous-jacente au phénomène de mémoire métabolique fait intervenir le stress oxydant. Initié par l'hyperglycémie, le stress oxydant conduit à un cercle vicieux favorisant l'accumulation des AGE dans les tissus organiques, cette accumulation agissant ensuite indépendamment de l'hyperglycémie. Les AGE tissulaires seraient alors un marqueur de la mémoire métabolique (14,71).

1.2.1 Etudes supportant le concept de mémoire métabolique

Le phénomène de mémoire métabolique a été observé dans des études expérimentales chez l'animal mais aussi dans plusieurs études d'intervention chez l'homme.

Chez le chien diabétique les effets d'un contrôle glycémique précoce ou différé ont été évalués. Ainsi, un bon contrôle glycémique a été réalisé soit après 2 mois dans un premier groupe soit après 2,5 ans de mauvais contrôle glycémique dans un deuxième groupe ; la rétine a ensuite été observée après 5 ans de suivi et les deux groupes ont été comparés à un groupe de chien ayant eu un bon contrôle glycémique tout au long du suivi et à un groupe de chien pour lequel le diabète n'a pas été contrôlé tout au long du suivi . Chez les chiens qui avaient eu un bon contrôle glycémique au bout de 2 mois, le taux de rétinopathie était faible et ne différait pas de ceux qui avaient eu un bon contrôle glycémique tout au long du suivi. Au contraire, les chiens pour lesquels un bon contrôle glycémique avait été instauré seulement après 2,5 ans de diabète avait un taux plus élevé de rétinopathie, similaire à celui des chiens pour lesquels le diabète n'avait pas été contrôlé tout au long du suivi (72).

Chez le rat, la transplantation d'îlots de Langerhans après plusieurs mois de diabète diminuait moins efficacement la progression de la rétinopathie que quand l'intervention avait eu lieu après quelques semaines de diabète (73).

Chez l'homme, l'étude Diabetes Complication and Control trial (DCCT) menée chez des patients atteints de diabète de type 1 est une étude majeure dans l'observation du phénomène

de mémoire métabolique. L'objectif de cette étude était d'évaluer si un traitement intensif, qui avait pour but de maintenir la glycémie proche de la norme, diminuait la fréquence et la sévérité des complications en comparaison à un traitement standard, qui avait pour but de prévenir les symptômes de l'hyperglycémie. Le traitement intensif correspondait à la mise sous pompe à insuline ou à au moins trois injections d'insuline par jour accompagnées d'une surveillance glycémique régulière. Le traitement standard correspondait à une ou deux injections d'insuline journalière. Les résultats de cette étude ont montré que le risque de complications était fortement diminué chez les patients ayant reçu le traitement intensif. En conséquence, après 6,5 ans de suivi tous les patients ont été mis sous traitement intensif et ont été suivis dans l'étude Epidemiology of Diabetes Intervention and complication trial (EDIC). Ce suivi a montré que l'effet du traitement intensif initial dans l'étude DCCT était prolongé. Ainsi dans l'étude EDIC, une dizaine d'années après la fin de l'étude DCCT et la mise sous traitement intensif de tous les patients, une incidence plus élevée des complications micro et macro vasculaires persistait chez les patients initialement mis sous traitement standard dans l'étude DCCT (74). Par exemple, 22 ans après le début de l'étude DCCT le risque de développer une diminution du débit de filtration glomérulaire était réduit de 50% chez ceux ayant initialement eu un traitement intensif (75). Après 10 ans de suivi dans l'étude EDIC, le risque de progression de la rétinopathie était réduit de 53% chez ces mêmes sujets (76) ; après 12 ans de suivi, le traitement intensif initial diminuait le risque d'évènements cardiovasculaires de 42% (77) ; et après 13 ans de suivi le risque de neuropathie était diminué de 64% chez les sujets ayant reçu le traitement intensif (78). Néanmoins, le taux d'HbA1c, un marqueur de l'équilibre glycémique sur les 3 derniers mois, ne différait pas (8,1% vs 8,0%) entre les deux groupes après 10 ans de suivi dans l'étude EDIC (76) (figure 4).

1.2.2 Bases moléculaires de la mémoire métabolique : stress oxydant et AGE

Plusieurs données suggèrent que l'hyperglycémie favorise le stress oxydant et l'inflammation. Or, ces derniers pourraient être prévenus si un bon contrôle glycémique était initié précocement au cours du diabète, car leurs effets sont ensuite difficiles à inverser quand un mauvais contrôle glycémique est maintenu à long terme.

Une étude *in vitro* a montré que la culture de cellules endothéliales en hyperglycémie pendant 14 jours suivis de 7 jours en normoglycémie maintenait la surproduction de radicaux libres malgré la normalisation de la concentration en glucose (81). Dans une étude menée sur l'animal, des rats diabétiques ont été mis sous mauvais contrôle glycémique pendant 2 ou 6 mois avant que la glycémie soit ensuite contrôlée pendant 7 mois. Chez ceux dont le mauvais contrôle glycémique a été appliqué pendant seulement 2 mois, les marqueurs du stress oxydant étaient réduits de 50% après l'instauration d'un bon contrôle glycémique. Au contraire, chez ceux dont le mauvais contrôle glycémique a été maintenu pendant 6 mois l'amélioration du contrôle glycémique n'a pas eu d'effet sur le niveau de stress oxydant (82). Dans une étude similaire, l'activité du facteur nucléaire Kappa B (NF- κ B), marqueur de l'inflammation, était 2,5 fois plus élevée chez le rat diabétique maintenu sous mauvais contrôle glycémique par rapport à des rats normaux. La ré-institution d'un bon contrôle glycémique après 2 mois diminuait partiellement l'inflammation tandis que la ré-institution d'un bon contrôle glycémique après 6 mois n'avait pas d'effet sur le niveau d'inflammation (83). Enfin, des résultats similaires ont été obtenus pour le rein. Des rats ont été maintenus sous un bon contrôle glycémique juste après l'induction de l'hyperglycémie ou 6 mois après. Les rats ont été sacrifiés 13 mois après l'induction du diabète. Chez ceux dont un bon contrôle glycémique avait été initié juste après l'induction de l'hyperglycémie, le niveau des marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation dans les urines et le cortex rénal ne différait pas de celui des rats contrôles normaux. Au contraire, chez ceux dont un bon contrôle glycémique était différé de 6 mois après l'induction du diabète, le stress oxydant et l'inflammation étaient plus élevés dans les urines et le cortex rénal (84).

Chez l'homme des études portant sur la fonction endothéliale au cours du diabète indiquent que l'hyperglycémie induit des dysfonctions endothéliales via la génération de stress oxydant. Cerriello et al ont montré que malgré la normalisation de la glycémie, le dysfonctionnement endothélial persistait chez les patients diabétiques de type 1. Néanmoins, il est possible d'améliorer la fonction endothéliale en utilisant un antioxydant, en particulier la vitamine C (85). En effet, chez des patients diabétiques de type 1, la normalisation de la glycémie réduit

le dysfonctionnement endothélial et le stress oxydant lorsque le diabète est de courte durée ou d'une durée inférieure à 5 ans et s'il est bien contrôlé. En revanche, dans le cas d'un diabète mal contrôlé pendant au moins 5 ans, la diminution du dysfonctionnement endothélial et du stress oxydant nécessite l'utilisation de la vitamine C en plus de la normalisation de la glycémie (86).

Brownlee et al ont suggéré que l'excès de production d'anions superoxydes (générateur de stress oxydant) par les mitochondries relie l'hyperglycémie aux complications du diabète. L'hyperglycémie intracellulaire induirait la production d'ions superoxydes par les mitochondries qui activerait plusieurs voies menant aux complications du diabète, dont la voie des polyols, l'activation de la protéine kinase C, la voie des hexosamines et en particulier la voie de la production des AGE (14). Dans le diabète, le méthylglyoxal, un précurseur des AGE réagit avec les protéines mitochondriales, leur glycation entraînant de nouveau un excès d'anions superoxydes indépendamment du niveau de glycémique. Ce cercle vicieux entre la production d'anion superoxydes, la formation des AGE et la glycation des protéines mitochondriales contribuerait à maintenir le phénomène de mémoire métabolique (28) (figure 5).

Par ailleurs, des études ont suggéré que l'exposition à l'hyperglycémie conduirait à des modifications épigénétiques durables qui participeraient aussi au phénomène de mémoire métabolique. Dans les cellules vasculaires humaines, une hyperglycémie transitoire peut induire des changements épigénétiques persistants, en particulier par la méthylation des histones (87–89) induisant elle-même des changements de la structure de la chromatine et de l'expression des gènes, et ce, malgré la restauration d'une normoglycémie (90). La modification des histones liée à l'hyperglycémie conduirait à un phénotype proinflammatoire dans lequel l'activité du facteur NF- κ B serait augmentée et participerait ainsi au développement des complications du diabète (79,90).

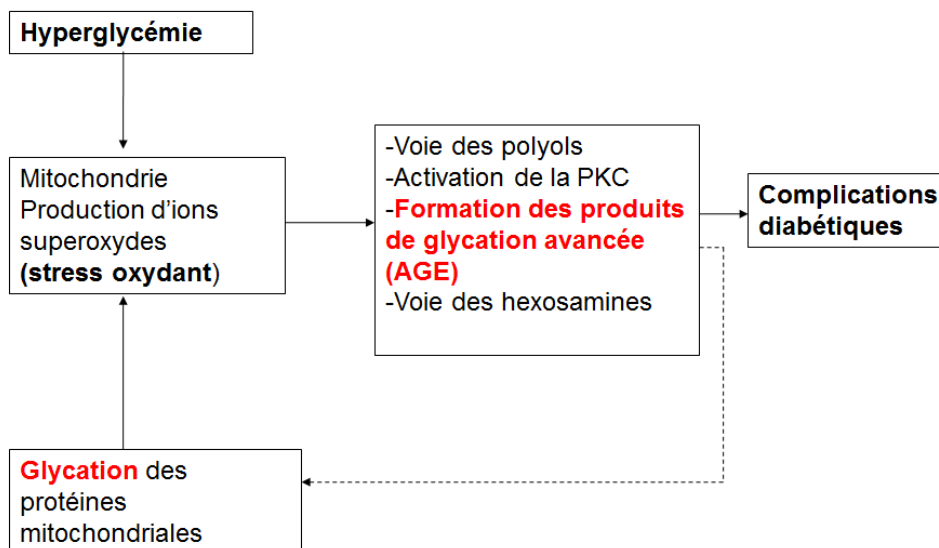


Figure 5. Mécanisme moléculaire des complications du diabète (14,28)

Les AGE sont des molécules toxiques ayant un effet à long terme car ils entretiennent le phénomène de mémoire métabolique. En effet, les AGE s'accumulent au cours du temps dans le corps. L'accumulation en excès des AGE induit des dommages tissulaires et un stress oxydant dans tous les organes. L'accumulation de ces molécules augmente naturellement avec l'âge, mais un excès de leur accumulation pouvant être dû à l'alimentation, l'hyperglycémie ou la maladie rénale contribue à accélérer le déclin multi-système. Il est de plus en plus évident que ces molécules jouent un rôle important dans les maladies chroniques liées à l'âge comme le diabète et ses complications, la démence, les rétinopathies ou la maladie rénale chronique. Ainsi, les AGE pourraient être considérés comme des marqueurs infracliniques des maladies liées à l'âge et des complications du diabète tout au long de la vie (figure 6).

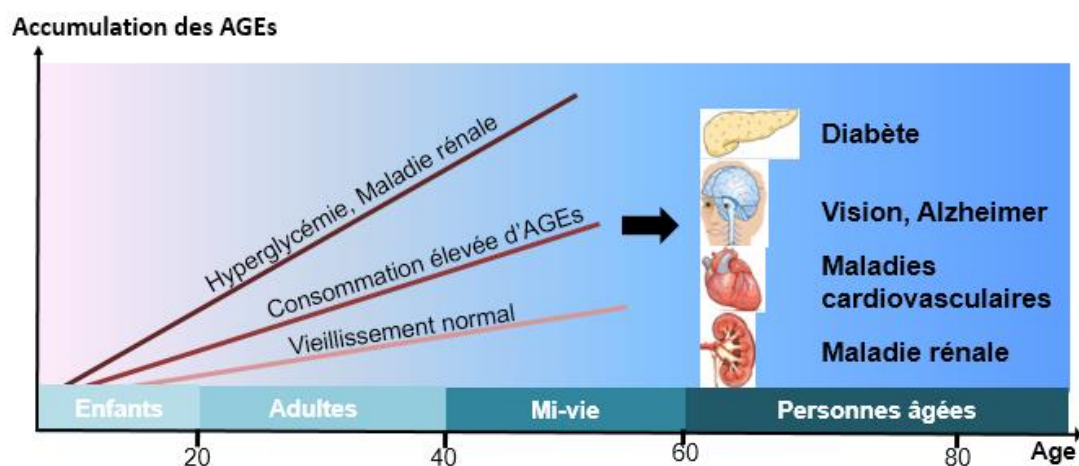


Figure 6. Accumulation des AGE au cours du temps

1.3 AGE et complications du diabète

Les complications associées au diabète sont regroupées en deux types : celles affectant les macro-vaisseaux (les artères larges, dont l'aorte, les fémorales et les artères coronaires) et celles affectant les micro-vaisseaux (les petits vaisseaux sanguins comme les capillaires des yeux, des reins ou des nerfs) (91–95). Les complications macro-vasculaires accélèrent le développement de maladies cardiovasculaires et de maladies vasculaires périphériques pouvant conduire notamment à un infarctus, un accident vasculaire cérébral ou une amputation. Les complications micro-vasculaires du diabète incluent l'atteinte des yeux (rétinopathie), la maladie rénale (néphropathie) et l'atteinte des nerfs (neuropathie) (96).

Les personnes atteintes de diabète de type 1 ou de type 2 ont un risque plus élevé de développer des complications vasculaires (91,97). De plus, la sévérité des complications est directement proportionnelle à la durée du diabète (98,99).

La formation des AGE est l'une des voies métaboliques qui relie l'hyperglycémie aux complications diabétiques (14). Le lien entre les AGE et les complications du diabète a été observé sur des modèles animaux dans lesquels des inhibiteurs des AGE prévenaient plusieurs manifestations structurelles ou fonctionnelles des complications du diabète (100,101). La formation intracellulaire de précurseurs des AGE conduit aux dommages retrouvés dans les complications du diabète par trois mécanismes : la modification et l'altération des protéines, la modification des matrices extracellulaires et la modification des protéines plasmatiques qui vont se fixer sur le récepteur RAGE des AGE activant le stress oxydant et l'inflammation (14). Par exemple, la formation des AGE sur le collagène de type I va être à l'origine de croisements covalents (102) ce qui altère les fonctions comme l'élasticité des vaisseaux. Les AGE peuvent aussi agir au niveau des interactions matrice-cellule en diminuant par exemple l'adhésion des cellules endothéliales (103).

1.3.1 Complications microvasculaires

Neuropathie et AGE

Dans la neuropathie diabétique, les nerfs périphériques et autonomes sont atteints. L'atteinte des nerfs autonomes peut être une cause de mort subite, alors que l'atteinte des nerfs périphériques est un déterminant majeur des lésions des membres inférieurs pouvant conduire à une ulcération ou à une amputation (104). Dans une large étude prospective de patients diabétiques, la prévalence de la neuropathie est passée de 7,5% au moment du diagnostic du

diabète à 50% après 25 ans (133). La neuropathie est associée à une réduction de la perfusion et à l'hypoxie des nerfs. Elle est aussi caractérisée par un changement de la microvascularisation dont l'épaississement des membranes basales et la dégénérescence des péricytes (105). Dans la neuropathie diabétique, les AGE ont été localisés dans les cellules endothéliales, les péricytes, les axones, les cellules de Schwann et la membrane basale. Les AGE affectent les protéines de structure des nerfs comme la tubuline, les neurofilaments ou la myéline des cellules de Schwann (106). Les modifications induites par les AGE sont à l'origine de changements structuraux et fonctionnels. In-vitro, l'incubation des cellules neuronales et des cellules de Schwann conduit à l'apoptose (107). L'interruption du transport axonal causé par la modification des neurofilaments et de la tubuline par les AGE pourrait contribuer à l'atrophie et à la dégénérescence des fibres nerveuses (106). La glycation de la myéline pourrait causer la démyélinisation des fibres nerveuses (107). Enfin, certains AGE comme le methylglyoxal modifient le fonctionnement des neurones nociceptifs causant une hyperalgésie (108).

Néphropathie et AGE

Cliniquement, la manifestation la plus précoce de la néphropathie est le développement d'une microalbuminurie persistante qui peut progresser vers une macroalbuminurie et une diminution du débit de filtration glomérulaire (109). Chez les patients diabétiques de type 1, si elle n'est pas traitée la néphropathie va progresser chez environ 80% d'entre eux sur une période de 15 ans (90). Parmi ces patients, 50% développeront une insuffisance rénale au stade terminal dans les 10 ans. La néphropathie diabétique est donc une cause majeure d'insuffisance rénale au stade terminal, elle représente aussi une cause d'invalidité et de mortalité importante chez les patients diabétiques (96). Le développement de la néphropathie diabétique est caractérisé par une hyperfiltration glomérulaire, l'épaississement des membranes basales, l'expansion de la matrice extracellulaire dans la région mésangiale et l'augmentation de l'albuminurie. Aux stades avancés, la néphropathie diabétique progresse avec l'apparition de la sclérose glomérulaire associée à des dysfonctionnements rénaux (110). Les AGE induisent l'apoptose des cellules mésangiales (111) qui jouent un rôle crucial dans la structure et la fonction des capillaires glomérulaires. L'apoptose des cellules mésangiales induite par les AGE pourrait contribuer à l'hyperfiltration glomérulaire observée aux stades précoces de la maladie rénale (112). Les AGE sont aussi impliqués dans la sclérose glomérulaire. La formation des AGE sur la matrice extracellulaire altère les interactions matrice-matrice et cellule-matrice. Par exemple, la glycation du collagène et de la laminine

réduit leur capacité à interagir avec les protéoglycanes, ce qui augmente la perméabilité vasculaire à l'albumine (113). De plus, en se formant sur les matrices, les AGE contribuent à l'épaississement des membranes basales et à l'expansion de la matrice extracellulaire dans la région mésangiale (105,114).

Rétinopathie et AGE

La rétinopathie est l'une des plus importantes complications micro-vasculaires du diabète et est une cause majeure de cécité (105). Dans une étude en population générale, la prévalence de la rétinopathie proliférative était plus élevée chez les participants pour lesquels le diabète avait débuté plus tôt (115). En effet, la prévalence de la rétinopathie augmente avec la durée du diabète. Les lésions de la rétinopathie diabétique peuvent être classées selon deux stades : la rétinopathie proliférante et la rétinopathie non proliférante. Le signe histologique le plus précoce de la rétinopathie est la perte des péricytes localisés au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires. En parallèle, il y a aussi plusieurs changements caractéristiques touchant les yeux dont l'épaississement des membranes basales, une hyperperméabilité et la formation de microanévrismes (116,117). Ces anomalies structurelles et fonctionnelles sont suivies d'occlusion microvasculaires dans la rétine ce qui conduit au stade prolifératif (116,117). Les AGE sont impliqués dans la perte et le dysfonctionnement des péricytes aux stades précoces de la rétinopathie (118,119). Il a été montré que les AGE retardaient la croissance et induisaient l'apoptose de péricytes en culture (111,120). De plus, les effets des AGE sur les péricytes pourraient être médiés par l'interaction des AGE avec leur récepteur RAGE. Enfin, les AGE sont aussi impliqués dans l'inflammation de la rétine, dans la thrombose et l'angiogénèse (105).

1.3.2 Complications macrovasculaires

Le diabète est associé à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires, d'infarctus du myocarde, d'accidents cérébrovasculaires et d'amputation des membres inférieurs (121). Les maladies cardiovasculaires seraient responsables de plus de la moitié des décès chez les patients diabétiques. Ces derniers ont un risque trois à dix fois plus élevé de développer un événement cardiovasculaire comparé à la population générale (122). L'athérosclérose, caractéristique des maladies cardiovasculaires, est un processus multicellulaire complexe qui implique l'endothélium, les cellules musculaires lisses, les plaquettes et les cellules

immunitaires qui interagissent pour former les plaques d'athéromes (96). Les AGE qui se forment sur la matrice extracellulaire de l'endothélium conduisent à une perte d'élasticité des vaisseaux sanguins (123). La modification des lipoprotéines de basse densité par la formation des AGE conduit à une diminution de leur clairance, ce qui contribue à l'athérosclérose (124). De plus, la liaison des AGE à leur récepteur RAGE conduit à la génération de réactifs oxygénés et à l'expression du facteur NF- κ B sur la paroi vasculaire, ce qui promeut l'expression de gènes associés à l'athérosclérose (125). Enfin les AGE ont la capacité d'induire la différenciation ostéoblastique des péricytes microvasculaires ce qui contribue à la calcification vasculaire et à l'accélération de l'athérosclérose (105).

1.4 AGE et vieillissement

Le vieillissement est caractérisé par le déclin anatomique et fonctionnel multi-organe ainsi que par la détérioration progressive des fonctions mitochondriales, l'augmentation du stress oxydant et de l'inflammation. Ce déclin multi-système est associé à l'augmentation des maladies liées à l'âge et à un risque plus élevé de décès. Au cours du vieillissement, l'accumulation des AGE est accélérée par la diminution de la capacité à répondre au stress. Les AGE jouent un rôle important dans le déclin anatomique et fonctionnel multi-organe (13,33). Plusieurs pathologies liées au vieillissement ont été associées aux AGE (Figure 7).

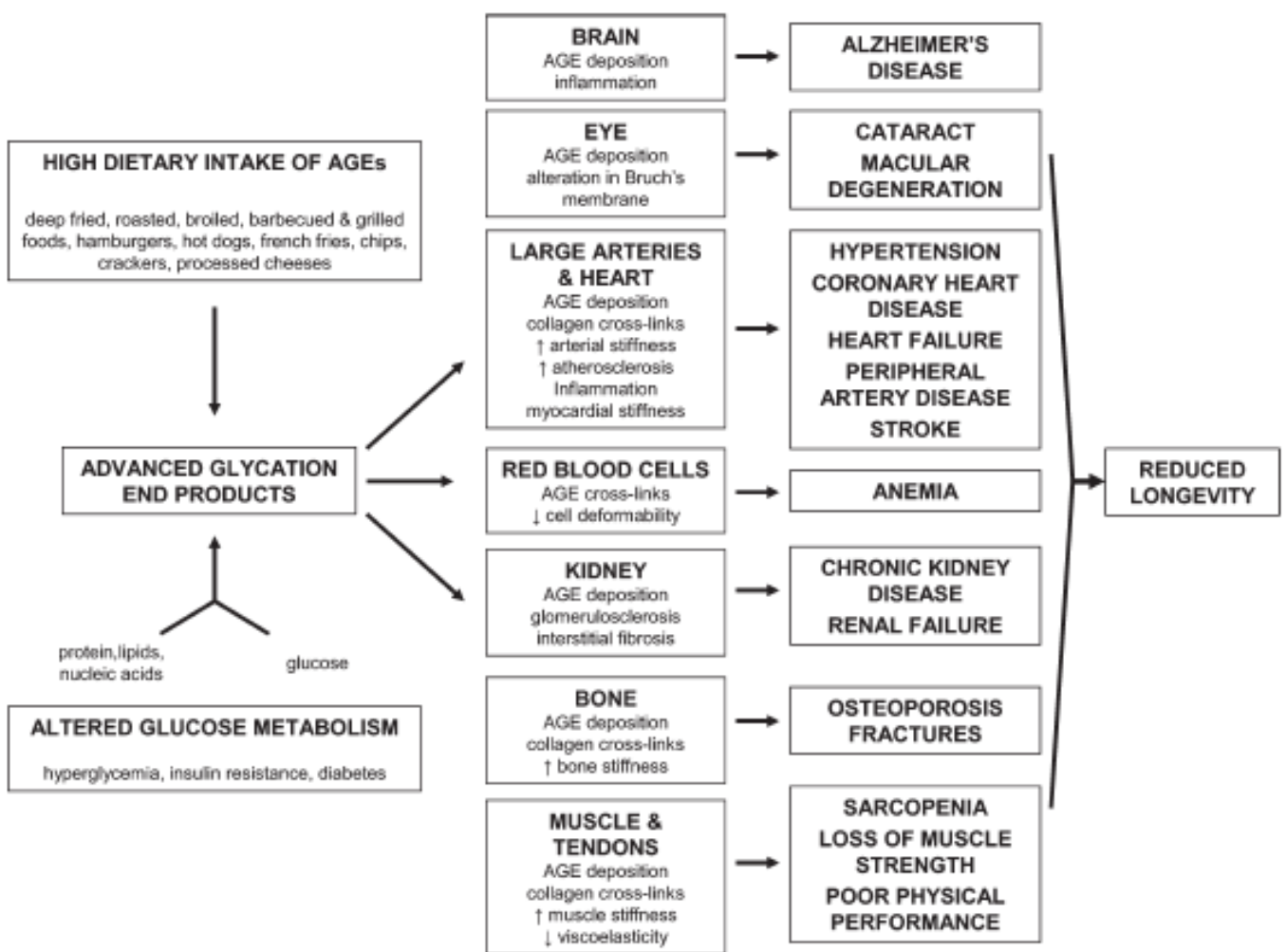


Figure 7. Modèle conceptuel des effets des AGE au cours du vieillissement (13)

Cerveau et AGE

Les AGE s'accumulent dans le cerveau humain avec l'âge (126) et ont été retrouvés dans les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (127). Les concentrations sériques ou urinaires d'AGE ont été associées au déclin cognitif chez les sujets diabétiques et non diabétiques (128,129). Chez les personnes âgées atteintes d'une maladie cérébrovasculaire, un taux élevé de carboxyméthyllysine a été trouvé dans les neurones corticaux et dans les vaisseaux cérébraux, et a été associé à la sévérité des troubles cognitifs (130). Les patients diabétiques ont un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer ; chez ces patients un dépôt plus important d'AGE et une activation de leur récepteur RAGE ont été détectés dans le cerveau (13).

Vieillesse oculaire et AGE

Avec l'âge, les AGE s'accumulent dans le cristallin et la rétine. Des protéines de structure du cristallin sont sensibles à la glycation et à la formation de liaisons covalentes avec les AGE. Les cristallins de patients atteints de cataracte ont un taux plus élevé d'AGE comme la CML, la pentosidine ou l'imidazole en comparaison à des cristallins sains (131). Un taux élevé d'AGE sériques a été trouvé chez des personnes âgées atteintes de cataracte, qu'elles soient diabétiques ou non (132).

Système cardiovasculaire et AGE

Les AGE jouent un rôle important dans l'athérosclérose (8). Avec l'âge, les AGE se déposent sur la paroi artérielle. Les lésions athérosclérotiques contiennent une forte concentration d'AGE (133). Les AGE forment des liens covalents avec les protéines matricielles sur la paroi des vaisseaux et réduisent leur élasticité. Ils altèrent aussi les propriétés fonctionnelles d'importantes molécules matricielles comme le collagène de type IV et la laminine (8). L'interaction des AGE avec son récepteur RAGE sur l'endothélium de surface génère un stress oxydant (134) ainsi qu'une inflammation (135). Enfin, dans l'étude italienne InCHIANTI, un taux élevé de CML plasmatique était un facteur de risque indépendant de mortalité toutes causes confondues et de mortalité cardiovasculaire (136).

Reins et AGE

Les concentrations plasmatiques d'AGE ont été indépendamment associées à l'altération de la fonction rénale chez des adultes non diabétiques (137). Il a été montré que des personnes âgées avec un taux élevé d'AGE sériques avaient une fonction rénale diminuée (138). Dans une large étude en population générale, les personnes âgées ayant un taux d'AGE

plasmatiques élevé avaient un risque plus élevé de déclin de la fonction rénale sur 6 ans de suivi (139).

Os et AGE

Le collagène des os est une molécule à longue vie, ce qui le rend particulièrement susceptible à la modification par les AGE. Des données suggèrent que l'accumulation des AGE dans les os contribue à la détérioration de leur structure et de leur qualité (140). La concentration des AGE dans les os augmente avec l'âge et est négativement associée à la densité osseuse et à la minéralisation (141). L'accumulation des AGE dans le collagène de la matrice osseuse altère les propriétés mécaniques des os, augmente leur rigidité et leur fragilité (142). Les AGE sériques sont significativement plus élevés chez les patients atteints d'ostéoporose en comparaison à des patients indemnes d'ostéoporose (143). Dans l'étude Health, Aging and Body Composition, les personnes âgées qui présentaient un taux élevé de pentosidine urinaire étaient à plus haut risque de développer des fractures (144).

Muscles, tendons et AGE

Les personnes âgées ont un taux élevé de croisements covalents et de dépôt d'AGE dans le muscle squelettique (145). Chez l'animal, les croisements covalents de collagène dans les muscles, les tendons et le cartilage sont associés à une augmentation de la rigidité des muscles, à une réduction de la fonction musculaire et à l'accumulation des AGE (145,146). Les AGE et leur récepteur RAGE peuvent aussi jouer un rôle dans la sarcopénie via l'activation de l'inflammation et le dysfonctionnement endothélial dans la microcirculation du muscle squelettique (147). Chez les personnes âgées, un taux élevé de CML circulant était indépendamment associé à une faible force de préhension et à une faible vitesse de marche (148).

1.5 Autofluorescence cutanée des AGE

Depuis quelques années, l'étude des AGE est facilitée par la mesure de l'autofluorescence (AF) cutanée liée aux propriétés optiques de fluorescence de certains AGE comme la pentosidine ou le collagène glyqué. Cette mesure, réalisée avec "l'AGE READER" au niveau de la peau, a l'avantage d'être non invasive, rapide et peu coûteuse (figure 8), ce qui la rend utile en pratique clinique (11). L'AF est exprimée en unité arbitraire et représente le ratio entre la lumière d'excitation à des longueurs d'ondes comprises entre 300 et 420 nanomètres et la lumière émise par les AGE à des longueurs d'ondes comprises entre 420 et 600 nanomètres (18). Par rapport aux AGE circulants qui présentent de fortes fluctuations par exemple en période post-prandiale, la mesure des AGE tissulaires a l'avantage d'être plus stable (149). En effet, les tissus avec un long turnover comme la peau ou les cristallins ont une forte accumulation des AGE et sont donc utilisables pour la mesure des AGE (150). Les valeurs de l'AF cutanée des AGE augmentent linéairement avec l'âge jusqu'à 70 ans (36). Elles sont corrélées aux concentrations de collagène glyqué, de pentosidine et de CML mesurées à partir de biopsies cutanées qui constituent le gold standard. La mesure de l'AF a été validée contre les biopsies cutanées chez des sujets en bonne santé, chez des sujets atteints de diabète de type 1, de diabète de type 2, chez des sujets avec une fonction rénale normale (11) et des sujets sous hémodialyse (151,152). Chez les personnes atteintes d'un diabète il a été reporté que l'AF a une variabilité intra-individuelle de 4,2 à 5,0% et une variabilité saisonnière de 5,9% (11,153,154). Les autres variables importantes pouvant influencer la valeur d'AF sont le statut tabagique, la couleur de la peau, la fonction rénale et la moyenne des HbA1c (153).

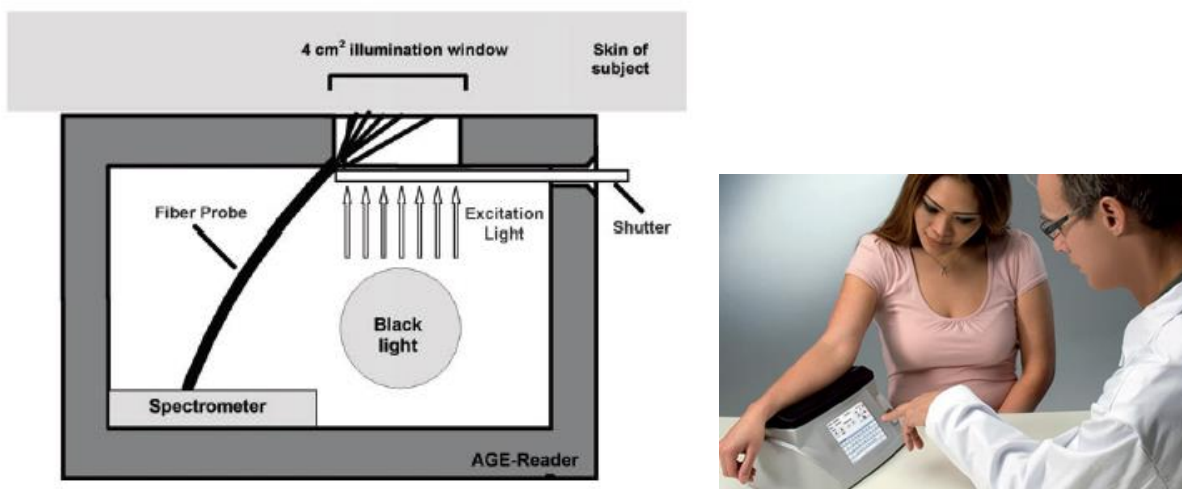


Figure 8. Fonctionnement de l'AGE READER (155)

1.6 Objectifs de la thèse

L'hypothèse principale de ce travail est que l'AF cutanée des AGE est un marqueur de la mémoire métabolique.

Le premier objectif de cette thèse était d'analyser la valeur de l'AF cutanée qui reflète l'accumulation cutanée des AGE en tant que marqueur de mémoire métabolique et d'identifier les déterminants cliniques et métaboliques du niveau d'AF en population générale chez les personnes âgées de la cohorte des 3-Cités.

Le second objectif de ma thèse était d'évaluer la valeur pronostique de l'AF cutanée pour les complications du diabète et d'analyser l'évolution de l'AF et ses déterminants sur 4 ans de suivi chez des patients atteints de diabète de type 1.

2 PARTIE 2 : METHODES

2.1 Présentation de la cohorte des 3-Cités

La première partie de ce travail a été réalisée au sein de l'échantillon bordelais de la cohorte des 3-Cités (3C). L'objectif principal de l'étude 3C était l'étude du risque de démence attribuable aux facteurs de risque vasculaires (156). L'étude 3C est menée dans 3 villes françaises, Bordeaux, Dijon et Montpellier depuis 1999-2001. A l'inclusion, les participants étaient âgés de 65 ans ou plus et non institutionnalisés. Ils ont été sélectionnés par tirage au sort sur les listes électorales, puis contactés par courrier pour leur proposer de participer à l'étude. Au total 9294 sujets ont été inclus dont 2104 à Bordeaux.

Après l'inclusion en 1999-2000, six visites de suivi ont été réalisées : à 2 ans (S1, en 2001-2002), à 4 ans (S2, en 2003-2004), à 7 ans (S4, en 2006-2008), à 10 ans (S5, en 2009-2011), à 12 ans (S6, en 2011-2012) et à 14 ans (S7, en 2014-2015) (Figure 9).

Le protocole initial a été approuvé par le CCPPRB (*Comité Consultatif de Protection des Personnes qui se prêtent à une Recherche Biomédicale*) du Kremlin-Bicêtre et par le CPP (*Comité de Protection des Personnes*) Sud-Méditerranée III pour le suivi.

Nos analyses porteront sur une sous-étude de la cohorte 3C dans laquelle la mesure des AGE par AF a été réalisée chez 468 sujets bordelais, lors du suivi à 10 ans (S5) de la cohorte 3C-Bordeaux à l'aide de l'AGE-READER.

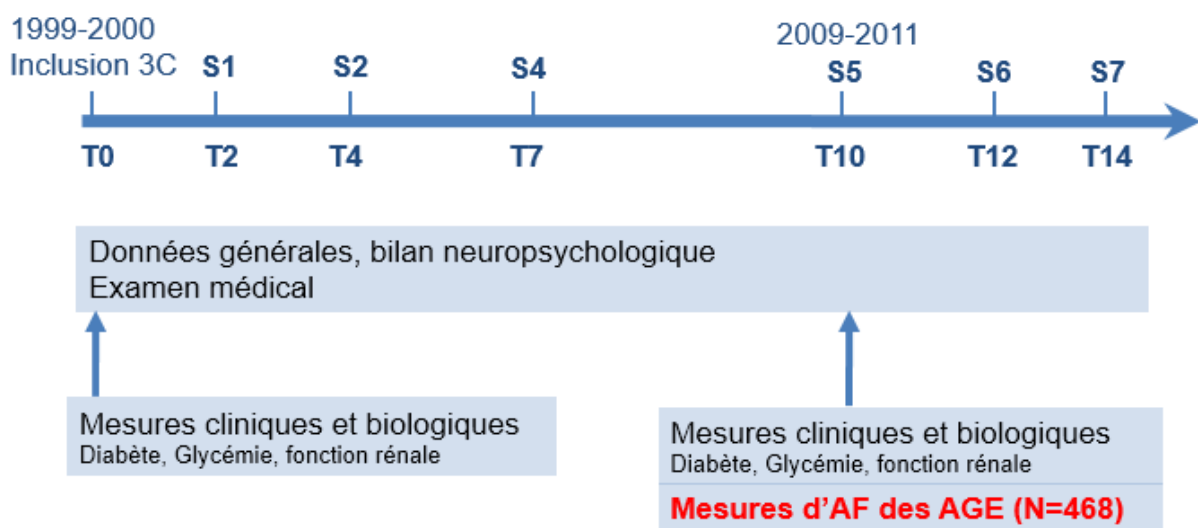


Figure 9. Schéma d'étude de la Cohorte des 3-Cités

2.2 Recueil des données

2.2.1 A l'inclusion

A Bordeaux, le premier entretien, qui comportait un questionnaire général et des tests cognitifs, était réalisé à domicile. Les participants étaient ensuite invités, s'ils le pouvaient, à se rendre au centre d'examen (véhicule spécialisé garé dans leur quartier d'habitation) pour les examens médicaux ultérieurs.

2.2.1.1 Données générales, psychologiques et cognitives

Les données générales ont été recueillies par un questionnaire standardisé, commun aux 3 centres, au cours d'un entretien réalisé par des psychologues et des infirmières formées au préalable. Les caractéristiques socio-démographiques des sujets ont été recueillies (âge, sexe, niveau d'études, revenu, catégorie socio-professionnelle, situation familiale et mode de vie, expositions professionnelles) ainsi que le type et la fréquence habituelle de consommation de boissons alcoolisées et de tabac, les principaux antécédents médicaux, notamment cardiovasculaires, l'état de santé physique et mentale (symptomatologie dépressive notamment), et la consommation de médicaments. Un auto-questionnaire recueillant les activités de loisirs et les caractéristiques liées au sommeil, venait compléter ces informations. Au cours du même entretien, les psychologues évaluaient les performances cognitives par une batterie de tests neuropsychologiques.

2.2.1.2 Mesures et données biologiques

Les mesures suivantes ont été réalisées à l'inclusion : pression artérielle systolique et diastolique, poids, taille, circonférence du bras, du mollet et du crâne. Une banque biologique (sérum, plasma et ADN, conservés à -80°C) a été réalisée chez 1881 sujets bordelais (89,4% de l'échantillon bordelais total) qui ont accepté le prélèvement sanguin. Les mesures de glycémie, HbA1c, cholestérolémie (cholestérol total, HDL, LDL) et triglycéridémie ainsi que le génotypage de l'ApoE ont été centralisés. Un examen échographique des artères carotides a été proposé aux participants de moins de 85 ans à l'inclusion. Une imagerie cérébrale était également proposée à certains participants.

2.2.2 Aux suivis

L'entretien médical, l'examen neuropsychologique et l'évaluation de l'état fonctionnel ont été réalisés à chaque visite de suivi (Figure 9). Suite à ces évaluations, les sujets cliniquement suspects de démence étaient vus par un neurologue. A chacun des suivis différents évènements étaient systématiquement recherchés: la démence, les AVC, l'infarctus du myocarde, l'incapacité, le placement en institution et le décès. De plus, à 10 ans de suivi des prélèvements biologiques ont été réalisés (glycémie, HbA1c, créatinine, cholestérol et triglycérides) et une mesure d'autofluorescence cutanée a été réalisée.

2.3 Variables d'intérêt

2.3.1 Mesure de l'Autofluorescence cutanée

Dans cette étude, parmi les 2104 sujets bordelais à l'inclusion 1214 sujets ont été revus à 10 ans ; parmi eux 625 sujets étaient venus à l'hôpital pour un examen ophtalmologique dans le cadre de l'étude Aliénor (Antioxydants Lipides Essentiels Nutrition et Maladies Oculaires) au cours duquel la mesure d'AF cutanée a été mise en place et réalisée sur un échantillon de 468 sujets. L'accumulation des AGE a été estimée par la mesure d'AF réalisée à l'aide de l'AGE-READER (DiagnOpticsTechnologies B.V., Groningen, Netherlands) et exprimée en Unité Arbitraire (UA) (11). L'AF exploitée dans les analyses est la moyenne de trois mesures réalisées au niveau interne de l'avant-bras. Les participants ayant une peau trop foncée (phototype de Fitzpatrick V et VI) n'ont pas pu être évalués du fait de la pigmentation de leur peau qui entraîne une réflectance inférieure à 10%.

2.3.2 Durée du diabète et durée de la maladie rénale chronique

A l'inclusion et au suivi nous avons distingué les participants ayant un diabète (glycémie à jeun ≥ 7 mmol/L ou prise d'un antidiabétique) de ceux ayant une intolérance au glucose ($6,1$ mmol/L \leq glycémie à jeun < 7 mmol/L et pas de prise d'antidiabétique) selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé (157). Au cours du suivi, nous avons considéré le diabète comme « absent » si les participants n'étaient pas diabétiques à l'inclusion et à 10 ans de suivi, « récent » si le diabète était présent uniquement à 10 ans de suivi et « ancien » si le diabète était présent depuis l'inclusion.

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) a été estimé par l'équation *The modification of diet in renal disease study* et la maladie rénale chronique a été définie par un DFG < 60 mL/min/1.73 m² (14). Pour les analyses, la maladie rénale chronique était considérée comme « absente » si les participants n'avaient pas de maladie rénale à l'inclusion et à 10 ans de suivi, « récente » si la maladie rénale était présente uniquement à 10 ans de suivi et « ancienne » si elle était présente depuis l'inclusion.

2.3.3 Variables d'ajustement

Les autres variables d'ajustement prises en compte dans cette étude ont été évaluées à l'inclusion et comprenaient :

- L'âge ;
- Le sexe ;
- L'IMC (taille/poids²), variable continue (poids et taille mesurés à l'inclusion) ;
- La présence d'une hypertension artérielle (pression artérielle systolique mesurée à l'inclusion \geq 140 mmHg ou pression artérielle diastolique \geq 90 mmHg ou prise d'un traitement antihypertenseur), variable binaire ;
- L'hypercholestérolémie (cholestérol total \geq 6,2 mmol/L ou prise d'un hypocholestérolémiant), variable binaire ;
- L'hypertriglycémie (triglycérides \geq 1,7 mmol/L), variable binaire ;
- Le tabagisme, variable catégorielle à trois classes (fumeur actuel, ancien fumeur, jamais fumé).

2.4 Présentation de la cohorte de patients ayant un diabète de type 1

La deuxième partie de cette thèse a été menée au sein d'un échantillon de 240 patients atteints de diabète de type 1, âgés de 18 ans ou plus lors de l'inclusion en 2009. Ils ont été recrutés à l'hôpital Haut-Lévêque (Bordeaux) (158). Après l'inclusion un suivi a été réalisé 4 ans plus tard en 2013. Un consentement éclairé a été signé par tous les patients. (Figure 10)

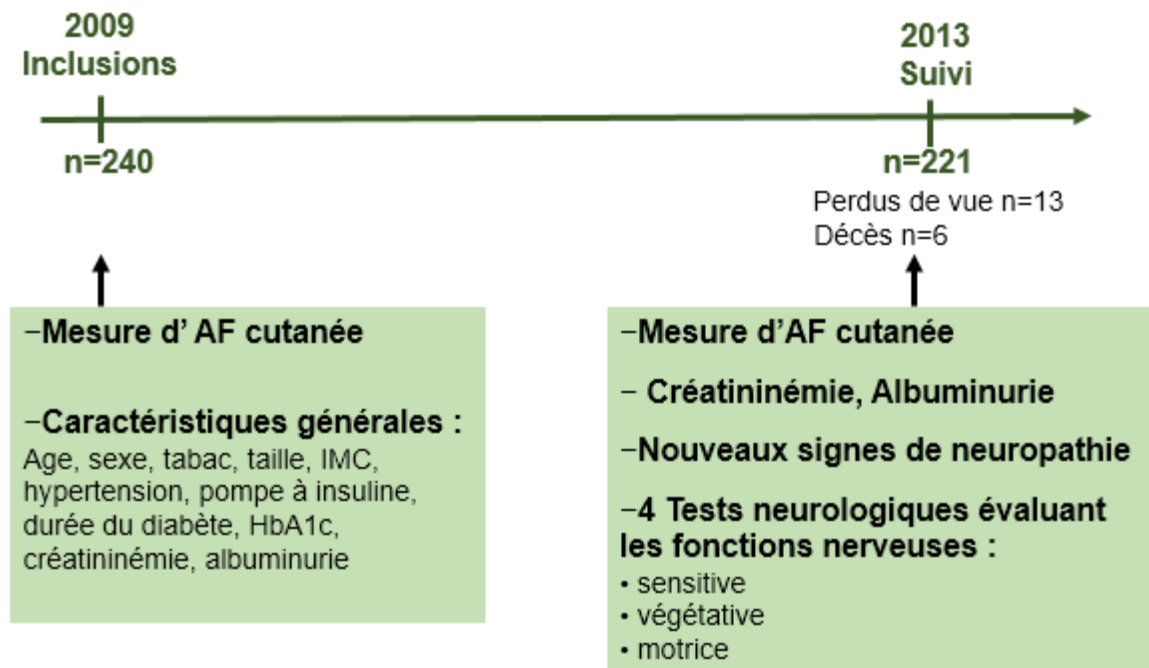


Figure 10. Schéma d'étude de la cohorte de diabétiques de type 1

2.5 Recueil des données

2.5.1 A l'inclusion

2.5.1.1 Mesure de l'autofluorescence cutanée

A l'inclusion en 2009, tous les participants ont eu une mesure d'AF cutanée. L'accumulation des AGE a été estimée par la mesure d'AF réalisée à l'aide de l'AGE-READER (DiagnOpticsTechnologies B.V., Groningen, Netherlands) et exprimée en UA (11). La mesure de l'AF exploitée dans les analyses est la moyenne de trois mesures réalisées au niveau interne de l'avant-bras. Les participants ayant une peau trop foncée (phototype de Fitzpatrick

V et VI) n'ont pas pu être évalués du fait de la pigmentation de leur peau qui entraîne une réflectance inférieure à 10%.

2.5.1.2 Données générales et cliniques

Les caractéristiques générales et cliniques ont aussi été recueillies à l'inclusion : âge, sexe, tabac, IMC, tension artérielle, utilisation de la pompe à insuline, durée du diabète, HbA1c, DFG et prise de médicament du système rénine angiotensine.

2.5.2 A 4 ans de suivi

A 4 ans de suivi en 2013, 221 patients ont été revus, et une deuxième mesure d'AF a été réalisée selon les mêmes modalités qu'à l'inclusion. Par ailleurs, des marqueurs de la fonction rénale comme la créatininémie permettant de définir le DFG et l'albuminurie ont aussi été recueillis.

L'apparition d'une neuropathie périphérique a été évaluée lors d'un entretien médical ou à partir du dossier médical ; les critères de présence d'une neuropathie étaient la présence d'une douleur neurogène et/ou la baisse de sensibilité ou la présence d'une plaie neurogène aux pieds ou la présence d'une ostéoarthropathie neurogène.

De plus, quatre tests neurologiques évaluant les fonctions nerveuses sensitive, végétative et motrice ont été réalisés :

- La fonction sensitive a été évaluée par le seuil de perception vibratoire à l'aide d'un neurothésiomètre (Arnold Horwell, London, U.K.) sur les deux hallux (159).
- Le questionnaire « Douleur Neuropathique en 4 Questions » est un questionnaire validé avec un score allant de 0 à 10 permettant d'évaluer le nombre de signes de douleurs neuropathiques (160).
- La force musculaire a été évaluée par un dynamomètre (161).
- La fonction autonome des nerfs a été évaluée par le SUDOSCAN. Il s'agit d'un outil non invasif permettant d'évaluer la fonction des glandes sudoripares au niveau des pieds et des mains par la mesure de la conductance électrochimique cutanée (159,162).

3 PARTIE 3 : RESULTATS

3.1 L'autoluorescence cutanée des AGE : marqueur de mémoire métabolique chez les personnes âgées en population générale (article 1)

3.1.1 Introduction

Le vieillissement est caractérisé par le déclin des fonctions physiologiques associé à un risque plus élevé de maladies liées à l'âge et de décès. Promouvoir un vieillissement en bonne santé nécessite de prendre en compte les expositions tout au long de la vie. Les AGE s'accumulent tout au long de la vie et reflètent l'exposition aux troubles métaboliques au cours du temps. Les AGE ont été impliqués dans les complications vasculaires du diabète mais aussi dans différentes maladies liées à l'âge. Le rôle important des AGE dans le phénomène de mémoire métabolique pourrait faire de l'accumulation des AGE un marqueur de santé à long terme.

La mesure d'AF cutanée qui reflète l'accumulation des AGE pourrait alors être un marqueur de santé d'un grand intérêt, apportant des informations sur l'exposition métabolique passée et indiquant le risque de maladies liées à l'âge. Cependant, la mesure d'AF cutanée n'a jamais été évaluée en population générale âgée et n'a jamais été considérée comme marqueur de la mémoire métabolique.

Dans cette étude, nous avons mesuré l'AF cutanée des AGE de manière non invasive. Cette mesure a permis d'estimer l'accumulation des AGE au suivi à 10 ans de la cohorte 3C. De manière rétrospective nous avons recherché les déterminants du niveau d'AF sur les 10 années antérieures, avec un intérêt particulier pour l'ancienneté du diabète et l'ancienneté de la maladie rénale chronique, deux déterminants importants de l'accumulation des AGE.

3.1.2 Discussion

Cette étude est la première étude longitudinale ayant montré que l'AF cutanée pourrait être un marqueur du passé métabolique chez les personnes âgées en population générale. L'AF est significativement plus élevée chez les patients ayant un diabète et une maladie rénale ancienne. L'AF est aussi associée à la glycémie, l'HbA1c et au DFG évalués 10 ans auparavant. Par contre, en analyse transversale, l'AF n'est associée ni à la glycémie ni à l'HbA1c, mais uniquement au DFG. Les autres variables recueillies à l'inclusion et associées à l'AF 10 ans plus tard étaient l'IMC, l'hypertriglycémie et le tabagisme. Les résultats de cette première étude montrent que l'AF cutanée apporte des informations sur l'exposition métabolique passée.

Le diabète de type 2 et la maladie rénale chronique sont des maladies insidieuses ; au stade précoce, elles sont asymptomatiques. Chez les patients nouvellement diagnostiqués, la mesure d'AF cutanée pourrait être d'un grand intérêt. Pour les cliniciens, cette mesure pourrait renseigner sur la durée du diabète et de la maladie rénale et ainsi aider à identifier les patients les plus à risque de développer des complications.

Certaines limites sont à prendre en compte dans cette étude, par exemple, les personnes âgées ayant une mesure d'AF à 10 ans de suivi sont des survivants, ce qui pourrait constituer une population particulière, en bonne santé. De plus, nous disposons d'un échantillon assez réduit. Néanmoins, nous disposons d'assez de puissance statistique pour détecter des associations significatives.

Research Article

Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products: Marker of Metabolic Memory in Elderly Population

K. Rajaobelina,^{1,2} A. Cougnard-Gregoire,^{1,2} C. Delcourt,^{1,2} H. Gin,³
P. Barberger-Gateau,^{1,2} and V. Rigalleau^{1,2,3}

¹INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), ISPED (Institut de Santé Publique d'Epidémiologie et de Développement), Centre INSERM U897-Epidémiologie-Biostatistique, Bordeaux, France.

²University of Bordeaux, France. ³Department of Nutrition-Diabetology, Haut-Lévêque Hospital, Pessac, France.

Address correspondence to Kalina Rajaobelina, MSPH, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) U 897, University of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, CS61292, 33 076 Bordeaux Cedex, F-33000 Bordeaux, France. Email: kalina.rajaobelina@isped.fr

Abstract

Background: Advanced glycation end products are involved in the vascular complications of diabetes, in chronic kidney disease, and in the aging process. Their accumulation in the elderly people, as reflected by skin autofluorescence (sAF), may be a marker of metabolic memory. We aimed to examine the association of sAF with glycemic and renal status 10 years earlier in older persons.

Methods: In retrospective cohort study, 328 elderly community dwellers aged of 75 years and over had sAF measurement 10 years after their inclusion in the Three-City cohort. Fasting plasma glucose and serum creatinine were measured at baseline and at 10-year follow-up. In 125 participants, HbA1c was available at these two times. Associations between sAF and the glycemic and renal status 10 years before were analyzed by multivariate linear regression adjusted for age, sex, hypertension, body mass index, hypertriglyceridemia, and smoking.

Results: Participants were 82.4 (standard deviation = 4.1) years on average, and their mean sAF was 2.8 (standard deviation = 0.7) arbitrary units (AU). After adjustment, sAF was higher in participants with long-standing diabetes (+0.38 AU, $p = .01$) or chronic kidney disease (+0.29 AU, $p = .02$) compared with healthy participants. sAF was related to fasting plasma glucose (+1 mmol/L associated with +0.08 AU, $p = .01$) and HbA1c (+1% associated with +0.15 AU, $p = .03$) 10 years earlier, but not to the current fasting plasma glucose ($p = .82$) and HbA1c ($p = .32$). sAF was also related to the distal and current estimated glomerular filtration rates ($p = .002$ and $.004$, respectively).

Conclusions: sAF reflects glycemic and renal status 10 years before, supporting its value as a marker of metabolic memory in the elderly people.

Key Words: Advanced glycation end products—Skin autofluorescence—Metabolic memory—Aging.

Decision Editor: Stephen Kritchevsky, PhD

“Metabolic memory” refers to exposure to a poor metabolic environment (mainly hyperglycemic) in the past, with risk of later vascular complications despite metabolic improvement (1,2). Advanced

glycation end products (AGEs) are involved in the vascular complications of diabetes (1), but their serum concentrations are not constantly high in people with diabetes or vascular diseases (3). AGEs

formation is a slow irreversible modification of proteins. Hence, they accumulate mainly in tissues containing long life-time proteins: Half-life of skin collagen is 15 years (4). There is a growing interest in this accumulation of AGEs that can be noninvasively assessed in the skin, based on their fluorescence. Indeed, the skin autofluorescence (sAF) of AGEs correlates with concentrations of glycated collagen, pentosidine, and CML (carboxymethyl-lysine) in skin biopsies (5). AGEs in the skin are associated with vascular complications of diabetes (6). This accumulation of AGEs measured by sAF is considered as a marker of metabolic memory, yet this remains to be demonstrated. As AGEs accumulate with age (7), their deposit should be especially detectable in elderly people.

Although other mechanisms like oxidative stress, activation of protein kinase C, polyols, and hexosamine pathways can contribute to the metabolic memory of past hyperglycemia, the important role of AGEs has been emphasized in several studies (1,2). In chronic kidney disease (CKD), oxidative stress, carbonyl stress, less detoxification, and reduced renal clearance lead to more accumulation of AGEs (8). Genetics may also be linked to the sAF (9). Through inflammation and tissue damages, long-term deposit of AGEs contributes to the decline of multiple organ systems in the aging process (7). However, in the general elderly population, where diabetes and CKD are common (10), measurements of sAF have rarely been reported, and it is unknown whether sAF relates to the glucose control and/or renal function of the previous years, as a marker of long-term metabolic memory.

The objective of this population-based study was to examine whether sAF was associated with glycemic status and renal function 10 years earlier in elderly community dwellers from the Three-City (3C)-Bordeaux cohort.

Methods

Study Population

This study is based on a subsample of the Bordeaux sample of the 3C study, a multicenter cohort of noninstitutionalized participants greater or equal to 65 years at baseline in Bordeaux ($n = 2,104$), Dijon ($n = 4,931$), and Montpellier ($n = 2,259$), France. The aim of 3C was to estimate the risk of dementia attributable to vascular factors. Details of the study have been described elsewhere (11). All participants gave their written informed consent. Data were collected using standardized questionnaires administered during face-to-face interviews at baseline and at four follow-up examinations performed at 2, 4, 7, and 10 years after the baseline. The 3C study has been approved by the Consultative Committee for the Protection of Persons participating in Biomedical Research of the Kremlin-Bicêtre University Hospital (Paris). This study is based on baseline and 10-year follow-up. At these time points, data collection included socio-demographic characteristics, measurement of blood pressure, height, and weight. Blood samples were drawn for measurement of glycemia and serum creatinine at both times.

Among 1,214 participants in Bordeaux at 10-year follow-up of the 3C study, sAF was measured in 468 participants who accepted to participate to a hospital examination in the frame of the ALIENOR (Antioxydants, Lipides Essentiels, Nutrition et maladies Oculaires) ancillary study of 3C (12). We excluded six outliers participants who had CKD at baseline (estimated glomerular filtration rate [eGFR] < 60 mL/min/1.73 m²) and no CKD 10 years later (eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m² at follow-up): Their first eGFR was presumably underestimated due to a transiently altered hydration status. Blood sample and determination of serum creatinine were available for 427 participants. Among them, 414 individuals had determination of

fasting plasma glucose at baseline (13 were nonfasting). Moreover, 328 participants also had determination of fasting plasma glucose and serum creatinine at 10-year follow-up. In this sample, HbA1c measurement was also available for 125 participants.

sAF Measurement

Measurement of sAF has been carried out in 2009–2011 at the 10-year follow-up of 3C at Bordeaux University Hospital. The accumulation of AGEs was estimated with sAF measured by the AGE Reader (DiagnOpticsTechnologies B.V., Groningen, Netherlands) and expressed in arbitrary units (AU) (5). Measurement was performed in triplicate at the skin site on the forearm. Participants with Fitzpatrick skin phototype V and VI were not evaluated due to their skin pigmentation with ultraviolet reflectance less than 10%.

Diagnosis and Duration of Diabetes

At baseline and at the 10-year follow-up, we distinguished participants with diabetes (fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/L or antidiabetic medication), impaired fasting plasma glucose (6.1 mmol/L \leq fasting plasma glucose < 7 mmol/L and no antidiabetic medication) and without impaired glucose metabolism (fasting plasma glucose < 6.1 mmol/L and no antidiabetic medication) according to World Health Organization criteria (13).

During the follow-up, diabetes was considered as “absent” if participants did not have diabetes at baseline and at 10 years, “recent” if they had diabetes only at 10 year, and “longstanding” if diabetes was present at both baseline and at 10 years.

Diagnosis and Duration of CKD

eGFR was estimated using the modification of diet in renal disease study equation, and CKD was defined as a value of eGFR < 60 mL/min/1.73 m² (14).

During the follow-up, CKD was considered as “absent” if participants did not have CKD at baseline and at 10-year follow-up, “recent” if they had CKD only at 10 years, and “longstanding” if it was present at both baseline and 10 years.

Other Variables

Age, sex, body mass index (body weight/height² [kg/m²]), and other potential confounding factors were considered at baseline: hypertension (if $\geq 140/90$ mm Hg or antihypertensive medication), hypercholesterolemia (if ≥ 6.20 mmol/L, or cholesterol-lowering medication), hypertriglyceridemia (if ≥ 1.7 mmol/L), and smoking habits.

Statistical Analysis

We described distribution of sAF according to the characteristics of the sample (Student's *t* test or analysis of variance depending on number of variable's classes).

As sAF is a continuous variable, a linear regression model was used to study the relations of interest with sAF at 10 years as dependent variable. In addition to age, sex, and smoking, which were forced in the models, we introduced the other metabolic confounding variables in multivariate models if they were associated with sAF and diabetes or CKD during follow-up at $p < .20$. For each analysis, we performed a first model (Model 1) adjusted on age and sex and a second model (Model 2), where we added the other metabolic confounding variables.

We first analyzed the relationship between duration of diabetes and CKD as explanatory variables and sAF as dependent variable in a single model. Absence of diabetes and CKD was considered

Table 1. sAF at 10-Year Follow-Up According to Characteristics at Baseline and at 10 Years (N = 328)

	Characteristics at Baseline			Characteristics at Year 10		
	n	sAF at Year 10, Mean (SD)	p	n	sAF at Year 10, Mean (SD)	p
Age, years						.76
75–79				108	2.76 (0.61)	
80–84				134	2.82 (0.64)	
≥85				86	2.78 (0.73)	
Sex						.01
Women				201	2.71 (0.58)	
Men				127	2.89 (0.73)	
Diabetes*			.003			.007
No	292	2.74 (0.63)		262	2.73 (0.63)	
Impaired fasting glucose	17	3.03 (0.71)		20	2.79 (0.70)	
Diabetes	19	3.21 (0.80)		46	3.10 (0.71)	
Chronic kidney disease†			.07			.01
No	294	2.76 (0.65)		191	2.70 (0.66)	
Yes	34	2.98 (0.66)		137	2.89 (0.63)	
Hypertension‡			.08			.15
No	86	2.68 (0.66)		56	2.67 (0.61)	
Yes	242	2.82 (0.65)		265	2.89 (0.66)	
Hypercholesterolemia§			.22			.70
No	136	2.84 (0.63)		137	2.80 (0.69)	
Yes	192	2.74 (0.67)		191	2.77 (0.67)	
Body mass index			.02			.19
<25	131	2.69 (0.59)		154	2.71 (0.58)	
25–30	144	2.79 (0.67)		130	2.83 (0.71)	
>30	53	2.99 (0.71)		44	2.88 (0.71)	
Hypertriglyceridemia¶			.05			.42
No	280	2.75 (0.64)		65	2.77 (0.68)	
Yes	48	2.95 (0.73)		263	2.84 (0.51)	
Smoking			.05			
Never	212	2.73 (0.59)				
Former	99	2.85 (0.76)				
Current	17	3.08 (0.70)				

Notes: sAF = skin autofluorescence; SD = standard deviation.

*No diabetes: fasting plasma glucose < 6.1 mmol/L and no antidiabetic medication. Impaired fasting plasma glucose: 6.1 mmol/L ≤ fasting plasma glucose < 7 mmol/L. Diabetes: fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/L or antidiabetic medication.

†eGFR < 60 mL/min/1.73 m².

‡Systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg or diastolic blood pressure ≥ 90 mm Hg, or antihypertensive medication.

§Plasma total cholesterol ≥ 6.20 mmol/L or cholesterol-lowering medication.

¶Plasma triglycerides ≥ 1.7 mmol/L.

as reference. In a second analysis, we studied the relation between glycemia and eGFR measured at baseline and at 10 years as continuous explanatory variables and sAF at 10 years as dependent variable. Finally, the same analysis was conducted for relation between HbA1c and eGFR measured at both times and sAF. Analysis of these relationships was performed in separate models at baseline and at 10 years because of strong correlation between variables at these two times. A sensitivity analysis was realized with variables at baseline and 10 years in the same model to examine effect of collinearity.

All analyses were performed with SAS Statistical Package release 9.3 (SAS Institute, Cary, NC) and a *p*-value of less than .05 was considered significant.

Results

As shown in Table 1, the study sample included 328 participants, among whom 201 (61.3%) were women. At 10-year follow-up, the mean age of the sample was 82.4 (standard deviation [SD] = 4.1) years, and mean sAF was 2.8 (SD = 0.7) AU. Between baseline and

10 years, proportion of participants with diabetes increased from 5.8% to 14.0% and proportion of participants with CKD increased from 10.4% to 41.2%. There were 19 (5.8%) participants with longstanding diabetes and 27 (8.2%) with recent diabetes. Concerning CKD, 34 (10.4%) were longstanding and 103 (31.4%) were recent. Among participants with hypertension, 66 (27.3%) used drugs of the renin angiotensin system at baseline and 135 (41.2%) at 10-year follow-up. Among the 125 participants with HbA1c measurements, the mean age was 82.1 (SD = 4.2) years and mean sAF was 2.9 (SD = 0.7) AU, similar to the whole population. At 10-year follow-up, prevalence of diabetes increased from 15.2% to 26.4%, mean HbA1c increased from 5.9% to 6.3%, and mean eGFR has declined by 10 mL/min/1.73 m².

sAF and Characteristics at 10 Years and at Baseline, 10 Years Before

In univariate analysis, value of sAF was significantly higher according to the duration of diabetes or CKD: sAF was 2.7 (SD = 0.6), 3.0 (SD = 0.7), and 3.2 (SD = 0.8; *p* = .004) for participants

without, with recent, and with long-standing diabetes, respectively (Supplementary Table). In the same way, sAF was 2.7 ($SD = 0.7$), 2.9 ($SD = 0.6$), and 3.0 ($SD = 0.7$, $p = .03$) for participants without CKD, with recent CKD, and with long-standing CKD, respectively. sAF values at 10 years were significantly associated with diabetes at baseline ($p = .003$) and with borderline significance, with CKD at baseline ($p = .07$); they were higher in men (Table 1). sAF also increased with body mass index and hypertriglyceridemia at baseline with borderline significance and was higher in people who had ever smoked (former or current) at baseline. At 10 years, only current diabetes and CKD were significantly associated with higher sAF. sAF did not differ according to use of drugs of the renin angiotensin system. At baseline, mean sAF was 2.79 ($SD = 0.65$) in users versus 2.75 ($SD = 0.67$) in nonusers ($p = .61$). At 10 years, mean sAF was 2.78 ($SD = 2.69$) versus 2.79 ($SD = 2.67$, $p = .95$).

Duration of Diabetes and CKD and sAF

The relationships between sAF and duration of diabetes and CKD are shown in Table 2. Only long-standing diabetes (vs no diabetes) and long-standing CKD (vs no CKD) were significantly associated to higher sAF at 10-year follow-up. Adjusted for age and sex, sAF was higher by 0.42 AU (95% confidence interval [95% CI] = 0.12; 0.42) in long-standing diabetes and by 0.32 AU (95% CI = 0.08; 0.55) in long-standing CKD. These associations remained significant after adjustment for other confounding variables. Nonsignificant intermediate values were found for recent diabetes and CKD.

sAF and Glycemia, HbA1c and eGFR at 10 Years and at Baseline 10 Years Before

As shown in Table 3, sAF was associated to the eGFR, but not to the glycemia at 10 years, whereas it was related to both parameters 10 years before: a glycemia higher of 1 mmol/L at baseline was significantly associated to higher sAF of 0.08 AU and an eGFR higher of 10 mL/min/1.73 m² lower sAF of 0.07 AU at 10 years. In the sensitivity analysis, we introduced in the same model variables at baseline and at 10-year follow-up. For glycemia, the same results was found,

Table 2. Multivariate Association* Between Diabetes and CKD During Follow-Up and sAF at 10 Years

	Model, N = 328		
	β	95% CI	<i>p</i>
Diabetes during follow-up [†]			.04
None	—	—	—
Recent	0.12	(-0.14; 0.39)	.36
Longstanding	0.38	(0.08; 0.69)	.01
CKD during follow-up [†]			.02
None	—	—	—
Recent	0.15	(0.00; 0.31)	.06
Longstanding	0.29	(0.05; 0.52)	.02

Notes: CKD = chronic kidney disease; sAF = skin autofluorescence.

*Estimated using a single linear regression model for diabetes and CKD, with absence of diabetes and CKD as classes of reference and adjusted for age at baseline, sex, hypertension, body mass index, hypertriglyceridemia, and smoking at baseline.

[†]“None”: participants did not have the disease at baseline and at 10-year follow-up. “Recent”: participants had the disease only at 10-year follow-up. “Longstanding”: participants had the disease at both baseline and 10-year follow-up.

but for eGFR, results lost significance, probably because of loss of power due to strong collinearity between variables at baseline and at 10 years. This association between sAF and glycemia at baseline was not significant in the patients without diabetes 10 years before ($p = .46$, $n = 309$), whereas the association between sAF and eGFR 10 years before was still significant, when limited to participants without CKD 10 years before ($\beta = -0.007$, $p = .02$, $n = 294$). At baseline, in the 125 participants with HbA1c measurements, the same association as with glycemia and eGFR was observed. Higher HbA1c of 1% and a lower eGFR of 10 mL/min/1.73 m² 10 years ago were respectively associated with an increase of 0.15 AU (95% CI = 0.02, 0.28) and 0.10 AU (95% CI = 0.01, 0.16) of sAF. However, current HbA1c and eGFR were not significantly associated to sAF (Table 3).

Discussion

AGEs have been suspected to play a role in the aging process for a long time (7), but this work is the first longitudinal study arguing for sAF of AGEs as a marker of metabolic memory in elderly participants from the general population. We found higher sAF in participants with long-standing diabetes and CKD, persisting after adjustment on age, sex, body mass index, hypertension, hypertriglyceridemia, and smoking. sAF was positively associated with 10 years earlier glycemia or HbA1c and negatively with 10 years earlier eGFR, and persisting after adjustment for other risk factors, whereas in the cross-sectional analysis, sAF was associated only with eGFR and not with current glycemia or HbA1c.

In the nondiabetic population, information on relationship between sAF and glycemia or HbA1c is scanty. Cross-sectional studies within patients with schizophrenia (15) or central obesity (16) found no association of sAF with the simultaneous glycemia, in accordance with our results. However, significantly higher sAF was repeatedly mentioned in both types of diabetes compared with healthy controls. Most of these studies highlighted an increase of sAF with increasing (self-reported) duration of type 1 diabetes (5,17–21). Type 2 diabetes is the most prevalent, as prevailing in our aged population, but its duration is not easy to appreciate because it is insidious. The relation between sAF and diabetes duration was significant in the pioneer work from Meerwaldt and colleagues (5,22), but more recent studies did not confirm this finding (21,23,24). Our study shows that sAF is higher in longstanding, than in recent diabetes.

The relation between sAF and distal—but not recent—fasting plasma glucose also argues for its value as a marker of metabolic memory. Only two studies, limited to patients with diabetes, have analyzed the cross-sectional relation between sAF and glycemia: In line with our finding, they did not find a significant association (18,25). Most of the studies that attempted to relate sAF to simultaneously determined HbA1c did not find any association, both in type 1 (17,20,21) and type 2 diabetes (5,26). This relation was detected in some reports (19): HbA1c reflects the long-term glucose control in stable patients. In the few studies where long-term HbA1c (means of HbA1c of the previous years) were registered, significant relations with sAF were reported (5,17–20). One prospective study has found a weak association between sAF and HbA1c over a short term of diabetes duration and follow-up (24): sAF poorly reflects short-term glycemic control. All these studies were performed in patients with diabetes, and this report is the first to relate sAF to plasma glucose and HbA1c 10 years before in a mixed population.

Renal function is also involved in accumulation of AGEs. To our knowledge, there was previously no information about the relation between sAF and eGFR in the general population. Few case-control

Table 3. Multivariate Association* Between Glycemia, HbA1c, and eGFR as Continuous Variables at Baseline and 10 Years, and sAF at 10 Years

Models	Sample With Fasting Glycemia			Sample With HbA1c			
	β	95% CI	<i>p</i>	Models	β	95% CI	<i>p</i>
At baseline [†]		N = 328				N = 125	
Glycemia	0.081	(0.016; 0.145)	.01	HbA1c	0.149	(0.019; 0.280)	.03
eGFR	-0.007	(-0.012; -0.003)	.002	eGFR	-0.008	(-0.016; -0.000)	.04
At 10-year follow-up [‡]		N = 319				N = 121	
Glycemia	0.009	(-0.067; 0.085)	.82	HbA1c	0.083	(-0.082; 0.248)	.32
eGFR	-0.008	(-0.013; -0.002)	.004	eGFR	-0.008	(-0.017; 0.002)	.11

Notes: eGFR = estimated glomerular filtration rate; sAF = skin autofluorescence.

*Estimated using a separate linear regression model for measures at baseline and 10 years. β coefficients are expressed for 1 unit increase of glycemia (mmol/L), HbA1c (%), and eGFR (mL/min/1.73 m²).

[†]Adjusted for age, sex, hypertension, body mass index in continuous, hypertriglyceridemia and smoking at baseline.

[‡]Adjusted for age, sex, hypertension, body mass index in continuous, hypertriglyceridemia at 10 years and smoking at baseline.

studies reported higher sAF in patients with CKD versus patients without CKD (19,27). In patients with both type of diabetes, presence of CKD was also associated to higher sAF (21). Some studies reported a significant increase of sAF as the severity of CKD increases (19,21,28) and with more prolonged CKD (27).

All studies that had looked at the relation between sAF with the concomitant eGFR found a negative association (19,20,26,28,29) as we did. This contrast with the absence of relation with the simultaneous fasting plasma glucose suggests a more rapid accumulation of AGEs in CKD than in diabetes. However, these cross-sectional associations do not indicate a causal relation. As time is needed to reach irreversible forms of AGEs, this association could already reflect renal damage due to AGEs accumulation, especially in a population of elderly people (7). Our report is the first to relate a negative association between sAF and eGFR 10 years before in general population of elderly people, also arguing for its value as a marker of metabolic memory.

Type 2 diabetes and CKD are insidious diseases; their early stages are often asymptomatic. In newly diagnosed patients, clinicians should be interested by markers of their duration to identify individuals most at risk of developing complications. By reflecting the past metabolic background, sAF could fulfill this need. Interestingly, we also found that sAF was associated to other risk factors present 10 years earlier (body mass index, hypertriglyceridemia, and smoking). It can also be noted that a high prevalence of hypertension in our population, involving high rate of angiotensin receptor blockers or angiotensin-converting enzyme use. These treatments are potentially associated with reduced AGEs formation (29) and have been taken into account in the definition of hypertension. Despite this adjustment, association between sAF and long-term glycemic and renal status persisted.

Our study has some limitations. First, sAF does not only reflect AGEs: Fluorescence of non-AGEs tissue components could be detected, whereas nonfluorescent AGEs were not measured. However, validation studies have shown a good correlation between sAF level and fluorescent and nonfluorescent AGEs directly analyzed in skin biopsies (5,6,30). Secondly, elderly individuals with sAF measured at 10 years of follow-up were survivors, which could constitute a particular, healthier, population. Then, in our sample, diabetes has low frequency and we had only one measurement of glycemia 10 years earlier. Finally, eGFR was presumably underestimated by the modification of diet in renal disease equation, but we did not use the new EPI-CKD formula because our serum creatinine measurements were not IDMS-traceable (30). All these limitations were expected to reduce the observed relations between sAF and the

glycemic and renal status: The value of sAF for dating might in fact be even better if used in more caricatural situations such as complicated diabetes or severe CKD. As recently reported in the elderly people, risks of complications are significantly higher when diabetes is present for more than 10 years (31). This noninvasive method helps to distinguish diabetes older than 10 year and could therefore be of have a great clinical interest.

Supplementary material

Supplementary material can be found at: <http://biomedgerontology.oxfordjournals.org/>

Acknowledgments

We thank K. Rajaobelina, A. Cougnard-Gregoire, C. Delcourt, H. Gin, P. Barberger-Gateau, and V. Rigalleau.

Conflict of Interest

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

References

1. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813–820. doi:10.1038/414813a
2. Bianchi C, Miccoli R, Del Prato S. Hyperglycemia and vascular metabolic memory: truth or fiction? *Curr Diab Rep*. 2013;13:403–410. doi:10.1007/s11892-013-0371-2
3. Hanssen NM, Engelen L, Ferreira I, et al. Plasma levels of advanced glycation endproducts N ϵ -(carboxymethyl)lysine, N ϵ -(carboxyethyl)lysine, and pentosidine are not independently associated with cardiovascular disease in individuals with or without type 2 diabetes: the Hoorn and CODAM studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E1369–E1373. doi:10.1210/jc.2013-1068
4. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2000;275:39027–39031. doi:10.1074/jbc.M006700200
5. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PH, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004;47:1324–1330. doi:10.1007/s00125-004-1451-2
6. Genuth S, Sun W, Cleary P, et al. Skin advanced glycation endproducts (AGEs) glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type I diabetes. *Diabetes*. 2014;64:266–278. doi:10.2337/db14-0215

7. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65:963–975. doi:10.1093/gerona/gdq074
8. Koyama H, Nishizawa Y. AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD? *Eur J Clin Invest*. 2010;40:623–635. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02298.x
9. LifeLines Cohort Study Group, DCCT/EDIC Research Group, Eny KM, et al. GWAS identifies an NAT2 acetylator status tag single nucleotide polymorphism to be a major locus for skin fluorescence. *Diabetologia*. 2014;57:1623–1634. doi:10.1007/s00125-014-3286-9
10. Rosner M, Abdel-Rahman E, Williams ME. Geriatric nephrology: responding to a growing challenge. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:936–942. doi:10.2215/CJN.08731209
11. 3C Study Group. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003;22:316–325. doi:10.1159/000072920
12. Delcourt C, Korobelnik JF, Barberger-Gateau P, et al. Nutrition and age-related eye diseases: the Alienor (Antioxydants, Lipides Essentiels, Nutrition et maladies OculaiRes) Study. *J Nutr Health Aging*. 2010;14:854–861. doi:10.1007/s12603-010-0131-9
13. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15:539–553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
14. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*. 2011;80:17–28. doi:10.1038/ki.2010.483
15. Kouidrat Y, Amad A, Desaillood R, et al. Increased advanced glycation end-products (AGEs) assessed by skin autofluorescence in schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2013;47:1044–1048. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.03.016
16. den Engelsen C, van den Donk M, Gorter KJ, Salomé PL, Rutten GE. Advanced glycation end products measured by skin autofluorescence in a population with central obesity. *Dermatoendocrinol*. 2012;4:33–38. doi:10.4161/derm.17999
17. Aroda VR, Conway BN, Fernandez SJ, et al. Cross-sectional evaluation of noninvasively detected skin intrinsic fluorescence and mean hemoglobin a1c in type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2013;15:117–123. doi:10.1089/dia.2012.0211
18. Felipe DL, Hempe JM, Liu S, et al. Skin intrinsic fluorescence is associated with hemoglobin A(1c) and hemoglobin glycation index but not mean blood glucose in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:1816–1820. doi:10.2337/dc11-0049
19. Sugisawa E, Miura J, Iwamoto Y, Uchigata Y. Skin autofluorescence reflects integration of past long-term glycaemic control in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:2339–2345. doi:10.2337/dc12-1077
20. Genevieve M, Vivot A, Gonzalez C, et al. Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 2013;39:349–354. doi:10.1016/j.diabet.2013.03.003
21. Chabroux S, Canouï-Poitaine F, Reffet S, et al. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. *Diabetes Metab*. 2010;36:152–157. doi:10.1016/j.diabet.2009.11.003
22. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, et al. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:2654–2659. doi:10.2337/dc05-2173
23. Tanaka K, Tani Y, Asai J, et al. Skin autofluorescence is associated with severity of vascular complications in Japanese patients with Type 2 diabetes: skin advanced glycation end products and diabetic vascular complications. *Diabet Med*. 2012;29:492–500. doi:10.1111/j.1464-5491.2011.03448.x
24. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, et al. Skin advanced glycation end product accumulation is poorly reflected by glycemic control in type 2 diabetic patients (ZODIAC-9). *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2:572–577. doi:10.1177/193229680800200407
25. Hu H, Han CM, Hu XL, Ye WL, Huang WJ, Smit AJ. Elevated skin autofluorescence is strongly associated with foot ulcers in patients with diabetes: a cross-sectional, observational study of Chinese subjects. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012;13:372–377. doi:10.1631/jzus.B1100249
26. Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PH, et al. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus—a multi-centre study. *Diabet Med*. 2012;29:1556–1561. doi:10.1111/dme.12005
27. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:3687–3693. doi:10.1681/ASN.2005020144
28. McIntyre NJ, Fluck RJ, McIntyre CW, Taal MW. Skin autofluorescence and the association with renal and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease stage 3. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:2356–2363. doi:10.2215/CJN.02420311
29. Nagai R, Murray DB, Metz TO, Baynes JW. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes*. 2012;61:549–559. doi:10.2337/db11-1120
30. Murata K, Baumann NA, Saenger AK, Larson TS, Rule AD, Lieske JC. Relative performance of the MDRD and CKD-EPI equations for estimating glomerular filtration rate among patients with varied clinical presentations. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:1963–1972. doi:10.2215/CJN.02300311
31. Huang ES, Laiteerapong N, Liu JY, John PM, Moffet HH, Karter AJ. Rates of complications and mortality in older patients with diabetes mellitus: the diabetes and aging study. *JAMA Intern Med*. 2014;174:251–258. doi:10.1001/jamainternmed.2013.12956

3.2 Autofluorescence cutanée et neuropathie périphérique 4 ans plus tard chez des patients atteints d'un diabète de type 1 (Article 2)

3.2.1 Introduction

La neuropathie diabétique est une complication qui affecte environ 50% des patients diabétiques (163). Il s'agit d'une atteinte neurologique périphérique, longueur dépendante, qui débute au niveau des membres inférieurs. Les symptômes de la neuropathie sont les douleurs neuropathiques, la réduction de la sensibilité et des réflexes au niveau des membres inférieurs (164,165). La neuropathie périphérique implique différentes fonctions nerveuses (164) ; c'est pourquoi dans cette étude nous avons évalué la sensibilité, la douleur et les fonctions motrices et autonomes.

L'accumulation des AGE a été observée sur les nerfs périphériques et jouent un rôle important dans les dommages axonaux et dans l'apoptose neuronale (166).

La mesure d'AF cutanée permet de manière simple et non-invasive d'évaluer l'accumulation des AGE. Cependant, il reste à établir s'il y a une relation entre la mesure d'AF et la neuropathie périphérique. Cette mesure pourrait permettre, chez les patients avec une AF élevée, d'être plus attentif à la recherche de signes de neuropathie et donc aider au diagnostic précoce.

Dans cet article, notre objectif était d'analyser la relation entre l'AF cutanée et la présence de la neuropathie périphérique 4 ans plus tard chez des patients atteints de diabète de type 1. Nous avons aussi analysé la relation entre l'AF cutanée et le résultat 4 ans plus tard de quatre tests neurologiques qui évaluent la douleur, la sensibilité et les fonctions motrices et autonomes.

3.2.2 Discussion

Chez nos patients atteints d'un diabète de type 1, une AF élevée était associée à un risque plus élevé de présenter une neuropathie périphérique 4 ans plus tard. Lorsque l'on s'intéresse à la relation entre l'AF et les tests neurologiques, le quartile le plus élevé de l'AF était associé au seuil de perception vibratoire, au score DN4, à la force musculaire et à la conductance électrochimique de la sueur au niveau des pieds. A notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant analysé la relation entre l'AF et cette combinaison de tests neurologiques destinés à évaluer la neuropathie périphérique en clinique.

Dans cette étude, certaines limites sont à prendre en compte. La neuropathie n'a pas été évaluée systématiquement à l'inclusion, les sujets atteints de neuropathie périphérique ne sont pas forcément des cas incidents. Par ailleurs, une causalité inverse est peu probable car l'accumulation des AGE a été observée sur les nerfs périphériques et joue un rôle important dans les dommages axonaux et l'apoptose neuronale (166).

En conclusion, la mesure simple et non invasive d'AF chez les patients atteints de diabète de type 1 pourrait être une mesure utile pour la détection précoce de la neuropathie. En effet, la neuropathie périphérique étant une complication irréversible, la détection au stade infraclinique pourrait être d'une grande utilité.

Skin autofluorescence and peripheral neuropathy four years later in type 1 diabetes

K Rajaobelina^{1,2*}
B Farges³
S Nov³
E Maury³
FL Cephise-Velayoudom³
H Gin^{2,3}
C Helmer^{1,2}
V Rigalleau^{1,3}

¹INSERM, ISPED, Centre INSERM U897-Epidemiology-Biostatistics, Bordeaux, France

²Univ. Bordeaux, ISPED, Centre INSERM U897-Epidemiology-Biostatistics, Bordeaux, France

³Nutrition-Diabetology Department, Haut-Lévêque Hospital, Pessac, France

*Correspondence to: Kalina Rajaobelina, INSERM U 1219, University of Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33 076 Bordeaux Cedex, France.
E-mail: kalina.rajaobelina@isped.u-bordeaux2.fr

Abstract

Objective Advanced glycation end products (AGEs) are involved in diabetes complications. We aimed to investigate whether the accumulation of AGEs measured by skin autofluorescence (sAF) was associated with signs of diabetic peripheral neuropathy and to sensitivity, pain, motor and autonomic function 4 years later in patients with type 1 diabetes.

Methods At baseline, 188 patients (age 51 years, diabetes duration 22 years) underwent skin autofluorescence measurement using the AGE Reader. Four years later, signs of diabetic peripheral neuropathy were defined as the presence of neuropathic pain and/or feet sensory loss or foot ulceration. Neurological tests were systematically performed: vibration perception threshold by neuroesthesiometry, neuropathic pain by the Douleur Neuropathique en 4 Questions score, muscle strength by dynamometry and electrochemical skin conductance. Multivariate analyses were adjusted by age, sex, height, body mass index, tobacco, HbA_{1c}, diabetes duration, estimated glomerular filtration rate and albumin excretion rate.

Results At the 4-year follow-up, 13.8% of patients had signs of diabetic peripheral neuropathy. The baseline sAF was higher in those with signs of diabetic peripheral neuropathy (2.5 ± 0.7 vs 2.1 ± 0.5 arbitrary units (AU), $p < 0.0005$). In the multivariate analysis, a 1 SD higher skin autofluorescence at baseline was associated with an increased risk of signs of neuropathy (OR = 2.68, $p = 0.01$). All of the neurological tests were significantly altered in the highest quartile of the baseline sAF (>2.4 AU) compared with the lowest quartiles after multivariate adjustment.

Conclusion This non-invasive measurement of skin autofluorescence may have a value for diabetic peripheral neuropathy in type 1 diabetes and a potential clinical utility for detection of diabetic peripheral neuropathy. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Introduction

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) affects approximately 50% of diabetic patients [1]. DPN occurs insidiously with a length-dependent pattern and starts distally, with symptoms such as neuropathic pain, foot reduced sensitivity and reflex [2,3]. Advanced glycation end products (AGE) play an important role in the pathophysiology of diabetic complications. Exposure to chronic hyperglycemia and oxidative stress leads to the formation of AGE; their

Received: 15 January 2016

Revised: 17 May 2016

Accepted: 24 May 2016

accumulation contributes to ‘metabolic memory’, to the functional modification of tissues and cells [4,5] and to the development of DPN [6]. In the Diabetes Control and Complications Trial study on type 1 diabetes, the AGE concentrations were higher in the skin biopsies of patients with neuropathy [7].

The accumulation of AGE in the skin can be assessed non-invasively based on the fluorescence of some AGE, such as pentosidine [8]. We recently showed that the skin autofluorescence (sAF) of AGE reflects the glycemic exposure of the preceding 10 years and, thus, could be a marker of metabolic memory in elderly subjects [9]. However, the relationship between the sAF and later DPN has not been explored in type 1 diabetes. We hypothesized that non-invasive measurement of AGE by sAF could have a value for the occurrence of signs and symptoms of neuropathy.

Thus, we aimed to analyse the relationship between sAF and signs of DPN 4 years later in patients with type 1 diabetes. We also analysed the association of sAF with four neurological tests that assessed pain, sensitivity, motor and autonomic function 4 years later.

Methods

Study population (Flow chart: Figure 1)

The study was conducted in a sample of adults with type 1 diabetes ($n = 240$) who were followed at the Nutrition-Diabetology unit of the University Hospital Haut-Levêque (Bordeaux, France) [10]. At baseline in 2009, 240 patients with type 1 diabetes and 18 years and older were recruited. The sAF was measured, and the general and clinical characteristics were recorded. At follow-up, 4 years after the baseline examination, signs of DPN were recorded, and four neurological tests that assessed each domain of nerve function involved in DPN were conducted.

Among the 240 patients who were included at baseline, 221 patients were seen 4 years later in 2013, 13 were lost to follow-up and 6 died. After the exclusion of 15 participants who were not screened for DPN and 18 participants who had missing data for anthropometric measurement and tobacco consumption, 188 participants were available for the analysis of the association between sAF and signs of DPN 4 years later. For the analysis of the association

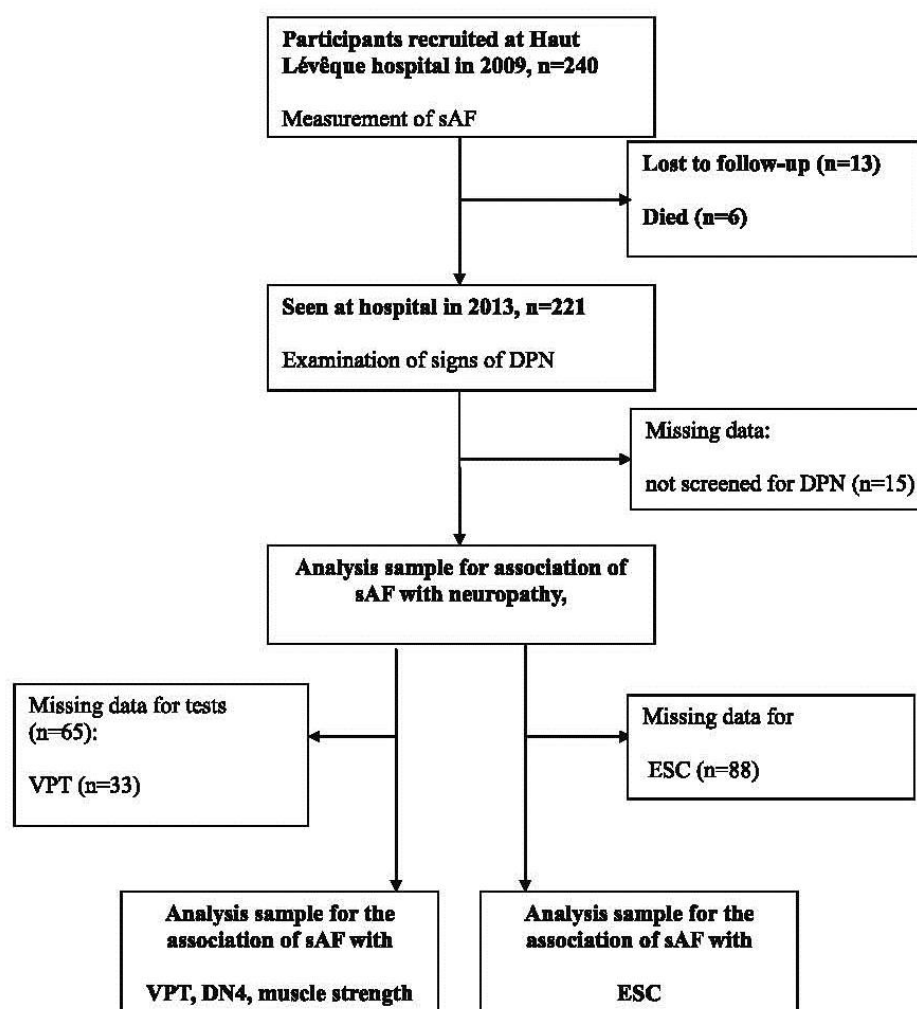


Figure 1. Flow diagram of the patient's participation

Skin Autofluorescence and Neuropathy

of sAF with neurological test results, 132 participants had evaluations with respect to vibration perception threshold (VPT), neuropathic pain and muscle strength, and 100 participants had measurements taken of their electrochemical skin conductance (ESC).

At baseline, the data collected included the age, gender, smoking, height, weight and body mass index (BMI, body weight/height² [kg/m²]), hypertension, use of an insulin pump, duration of diabetes (years), HbA_{1c}, estimated glomerular filtration rate (eGFR, estimated with the CKD-EPI formula) and urinary albumin excretion rate (AER).

Standard protocol approvals, registrations and patient consents

Written informed consent was obtained for all participants.

Skin autofluorescence measurement

The accumulation of AGE in skin was measured at baseline by the AGE reader (DiagnOptics BV, Groningen, the Netherlands) and expressed in arbitrary units (AU) [8]. The measurement was performed at a normal skin site without scars, lichenification or other abnormalities. The Fitzpatrick phototypes V and VI were not evaluated because of their skin pigmentation, which had ultraviolet reflectance of <10% [11].

Assessment of neuropathy

At the 4-year follow-up examination, signs of DPN were defined by the occurrence of neuropathic pain and/or feet sensory loss, foot ulceration or neuropathic osteoarthropathy (in one case) [12].

Neurological tests

The VPT for the assessment of sensitive function in peripheral neuropathy was measured by neurothesiometry (Arnold Horwell, London, U.K.) at the two halluces. The neurothesiometer was applied with a progressive increase in voltage until the patient perceived the vibration. The VPT was expressed in volts (V) and calculated as the mean of the right and left halluces [13].

The 'Douleur Neuropathique en 4 Questions' (DN4) is a validated screening questionnaire for neuropathic pain with a score between 0 and 10 that indicates the number of signs of painful neuropathy [14]. The DN4 evaluates seven items that are assessed by interview and three items that are assessed by physical examination. Each item is

scored as 1 if a positive response is given and 0 if a negative response is given. The interview consisted of questions about the pain characteristics (burning, painful, cold, electric shocks, tingling, pins and needles sensation, numbness and itchiness). The physical examination tested sensitivity to touch, pinprick and brush. For the present study, we considered a score of ≥ 1 to be clinically significant.

Muscular strength was assessed by dynamometry. We performed three consecutive measurements of the hand-grip strength in the dominant hand with a calibrated dynamometer (Takei Scientific Instruments, Tokyo, Japan). The mean of the three values was recorded [15].

The autonomic nerve function was assessed by Sudoscan, which is a non-invasive test that is designed to evaluate sweat gland function based on ESC. The ESC is generated by a direct current stimulus (≤ 4 V) applied to the electrodes and sodium chloride of sweat. The ESC is expressed in microSiemens (μ S) and is the ratio of the current generated in proportion to the chloride involved in electrochemical reaction with electrodes and the direct current stimulus [13,16]. For the current study, we used the mean ESC of the feet.

Statistical analysis

In the univariate analysis, participants with and without signs of neuropathy were compared according to their characteristics at baseline and their results in the neurological tests; Student test was used for continuous variables, and the χ^2 test or Fisher test was used for the categorical variables. The VPT was log-transformed because the distribution was skewed. To analyse the association between the sAF and DPN at 4 years, we considered the sAF to be a continuous variable. However, for neurological tests, the relation between the sAF and all of the neurological tests except for the muscle strength was not linear. Thus, we categorized the sAF into quartiles: $sAF \leq 1.75$ AU, $1.75 < sAF \leq 2.00$, $2.00 < sAF \leq 2.40$ and $sAF > 2.40$. The results of the neurological test were compared according to the sAF quartiles. First, we used a global test of ANOVA to compare the quantitative results of the neurological tests and a Fisher test for the percentage of subjects with a score of ≥ 1 for the DN4 questionnaire. Then, to compare the highest quartile ($sAF > 2.40$) to the three others, a Student test and χ^2 test were used.

In the multivariate analysis, the baseline characteristics that were associated with both the presence of signs of neuropathy at follow-up and with sAF at $p < 0.25$ were introduced into the models; the HbA_{1c} was forced. For each analysis, we performed a first model (Model 1) that included the sAF, age and sex. In a second model (Model 2), the height, BMI, smoking status, hypertension, HbA_{1c} and diabetes duration were added. Finally, in a third

model (Model 3), the eGFR and AER were added. Logistic regression models were used to determine the association between the sAF and signs of DPN; the sAF was transformed into the Z-score, and the odds ratios were expressed as +1 SD change in the sAF. For the association between sAF and the results of neurological tests, the highest sAF quartile was compared with the three other quartiles. Logistic regression models were used for the analysis of the DN4 score (dichotomous variable, DN4 score ≥ 1). Linear regression models were used for the three other neurological tests (continuous variables). For the analysis of the relationship of sAF with muscular strength, an interaction term between sAF and sex was introduced in the model; if it was significant the analysis was realized separately in men and women.

All analyses were performed with SAS Statistical Package release 9.3 (SAS Institute, Cary, NC) and a *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Baseline characteristics and neuropathy at the 4-year follow-up

The study sample included 188 patients; 43.1% were women with an average age of 51.4 (SD = 15.8) years, and the mean diabetes duration was 22.2 (SD = 13.3)

years. Four years after the measurement of sAF, 26 (13.8%) patients had signs of DPN; compared with patients without DPN, these patients were older, had longer diabetes duration, more hypertension, lower eGFR, higher AER and higher sAF at baseline (Table 1).

In the multivariate analysis, the association between zAF and DPN is still significant, with an increase in the odds ratio that is related to the Z-score sAF even after adjustment for vascular risk factors in model 2 and renal function in the model 3. In the fully adjusted model, the sAF, age, height, BMI, diabetes duration and HbA_{1c} were independently associated with DPN. Each SD change in sAF was associated with a 2.68 greater likelihood of having a sign of DPN at the 4-year follow-up (Table 2).

Neurological tests at the 4-year follow-up

The majority of neurological tests displayed a normal value of the function that was measured: in the sample of 132 patients, the mean VPT was 11.3 (SD = 10.2) V, 38.6% had a DN4 score ≥ 1 , the mean muscle strength was 31.2 (SD = 12.2) kg and the mean feet ESC was 74.0 (SD = 12.6) μ S in the sample of 100 patients.

Compared with the other patients, the patients with signs of neuropathy had higher VPT (25.9 vs 9.6 V, *p* < 0.0001 after log transformation), lower muscle

Table 1. Characteristics at baseline according to presence of peripheral neuropathy 4 years later (n = 188)

	Neuropathy at 4-year follow-up		<i>p</i> ^a
	Yes n = 26	No n = 162	
General characteristics			
Age, years, mean (SD)	61.6 (13.6)	49.6 (15.5)	<0.0001
Women, n (%)	7 (26.9)	74 (45.7)	0.07
sAF, arbitrary units, mean (SD)	2.5 (0.7)	2.1 (0.5)	0.0005
Height, cm, mean (SD)	171.1 (8.9)	168.9 (8.7)	0.24
BMI, mean (SD)	27.2 (6.0)	23.7 (3.7)	0.05
Smoker, n (%)			0.22
No	17 (65.4)	124 (76.5)	
Yes	9 (34.6)	38 (23.5)	
Diabetes			
Duration, years, mean (SD) ^b	32.2 (15.5)	20.8 (12.3)	<0.0001
HbA _{1c} , %, mean (SD)	7.8 (1.5)	7.6 (0.9)	0.51
HbA _{1c} , mmol/mol, mean (SD)	62 (16.4)	60 (9.8)	0.51
Insulin pump, n (%) ^c	4 (15.4)	36 (22.2)	0.60
Arterial hypertension, n (%) ^d	18 (69.2)	65 (40.4)	0.006
Renal function			
AER, mg/24 h, mean (SD) ^e	136.1 (384.6)	35.5 (133.0)	0.01
eGFR, mL/min/1.73 m ² , mean (SD) ^f	73.0 (24.6)	89.8 (23.2)	0.001

Abbreviations: AER, albumin excretion rate; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HbA_{1c}, glycosylated haemoglobin; sAF, skin autofluorescence.

^aStudent and Chi square tests were used except where noted.

^bTen missing data.

^cFisher test was used.

^dOne missing data.

^eSix missing data.

^fNine missing data; eGFR was estimated by the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration) formula.

Skin Autofluorescence and Neuropathy

Table 2. Multivariate association between z-score sAF at baseline and DPN at 4-year follow-up

	Model 1 <i>n</i> = 188			Model 2 <i>n</i> = 177			Model 3 <i>n</i> = 165		
	OR	(IC 95%)	<i>p</i>	OR	(IC 95%)	<i>p</i>	OR	(IC 95%)	<i>p</i>
z-score sAF	1.86	(1.18–2.92)	0.007	2.21	(1.17–4.19)	0.01	2.68	(1.27–5.66)	0.01
Age	1.05	(1.02–1.09)	0.006	1.05	(1.01–1.10)	0.03	1.08	(1.01–1.15)	0.02
Sex	0.35	(0.12–0.99)	0.05	1.91	(0.37–10.01)	0.44	1.52	(0.26–9.07)	0.65
Height				1.10	(1.01–1.20)	0.02	1.10	(1.01–1.21)	0.03
BMI				1.22	(1.06–1.39)	0.004	1.25	(1.07–1.47)	0.006
Smoker				1.64	(0.58–4.68)	0.35	2.79	(0.89–8.77)	0.08
Hypertension				1.37	(0.42–4.47)	0.60	0.82	(0.20–3.30)	0.78
HbA _{1c}				1.58	(0.98–2.56)	0.06	1.94	(1.12–3.36)	0.02
Diabetes duration				1.06	(1.01–1.12)	0.02	1.08	(1.02–1.14)	0.01
eGFR							0.99	(0.96–1.03)	0.71
AER							1.00	(1.00–1.00)	0.56

Abbreviations: AER, albumin excretion rate; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HbA_{1c}, glycosylated haemoglobinA1c; sAF, skin autofluorescence. Odds ratios are expressed as per SD change of sAF.

strength (24.8 vs 32.0 kg, *p* = 0.04) and lower feet ESC (61.5 vs 75.4 μS, *p* < 0.001) (Table 3). These patients also tended to have a score of ≥1 on the DN4 questionnaire (57.1 vs 36.4%, *p* = 0.13) but the difference was not significant.

sAF and neurological tests

The performances on the four tests according to the quartiles of sAF at the baseline are shown in Table 4.

Compared with the other quartiles, the performances were significantly worse in the highest quartile for all of the tests. Between the lower and the highest quartile of sAF, there was an increase of approximately 10 V of VPT, an increase of 25% in individuals with a DN4 score of ≥1, a loss of 10 kg in hand strength and a decrease of 10 μS in the feet ESC.

After multivariate adjustment, the highest quartile of sAF was associated with poorer neurological test performances in three out of the four tests. A sAF of >2.4 was associated with a higher VPT (logarithm β = 0.36, 95%

Table 3. Neurological tests and diabetic peripheral neuropathy at 4-year follow-up

Neurological tests	Sample size	All	Diabetic peripheral neuropathy		<i>p</i> ^a
			Yes <i>n</i> = 14	No <i>n</i> = 118	
VPT (V), mean (SD)	132	11.3 (10.2)	25.9 (10.5)	9.6 (0.8)	<0.0001
DN4 score ≥1, <i>n</i> (%)	132	51 (38.6)	8 (57.1)	43 (36.4)	0.13
Muscle strength (kg), mean (SD)	132	31.2 (12.2)	24.8 (10.4)	32.0 (12.2)	0.04
Feet ESC (μS), mean (SD)	100	74.0 (12.6)	61.5 (15.4)	75.4 (11.5)	0.001

Abbreviations: DN4, Douleur neuropathique en 4 questions; ESC, electrochemical skin conductance; VPT, vibration perception threshold. ^aStudent test was performed for continuous variables with log transformation for VPT and Fisher test for the categorical variable.

Table 4. Neurological tests at 4-year follow-up according to baseline quartiles of sAF

Quartiles of sAF	VPT (V), mean (SD) <i>n</i> = 132	DN4 score ≥1, <i>n</i> (%) <i>n</i> = 132	Muscle strength (kg), mean (SD) <i>n</i> = 132	Feet ESC (μS), mean (SD) <i>n</i> = 100
≤1.75	8.2 (8.0)	11 (33.3)	36.0 (13.3)	75.2 (10.9)
]1.75–2.00]	7.6 (6.2)	14 (37.8)	32.8 (11.9)	72.7 (12.4)
]2.00–2.40]	11.1 (9.5)	7 (23.3)	30.1 (11.1)	80.7 (6.1)
>2.40	19.0 (12.7)	19 (59.4)	25.6 (10.3)	68.1 (15.9)
<i>P</i> values				
Global ^a	<0.0001	0.03	<0.0001	0.006
Highest versus the others ^b	0.0001	0.006	0.002	0.03

Abbreviations: DN4, Douleur neuropathique en 4 questions; ESC, electrochemical skin conductance; VPT, vibration perception threshold. ^aANOVA was performed for continuous variables with log transformation for VPT and Fisher test for DN4 score (categorical variable). ^bStudent test was performed for continuous variables with log transformation for VPT and χ^2 test for DN4 score.

IC = 0.06 to 0.65, $p = 0.02$), a greater likelihood of a DN4 score of ≥ 1 (OR = 4.21, 95% IC 1.40 to 12.71, $p = 0.01$) and a lower feet ESC ($\beta = -8.75$, 95% IC = -15.22 to -2.29 , $p = 0.01$). For the muscle strength, an interaction between the sAF and sex was found ($p < 0.0001$), and the association was significant in women with a lower muscle strength of -4.75 kg (95% IC = -0.79 to -8.71 , $p = 0.01$, $n = 53$) but not in men ($\beta = -1.0$, 95% IC = -5.38 to 3.38 , $p = 0.65$, $n = 64$).

Discussion

The deposit of AGE in the peripheral nerves of patients with diabetes is a well-known mechanism for neural lesions [6]. The development of sAF provides a simple, quick, non-invasive mode of measurement but it remains to be established whether this measurement can help in the early diagnosis of DPN. In our patients with type 1 diabetes, a high sAF was associated with a higher risk of signs of neuropathy 4 years later, and the highest quartile of sAF was associated with the worst neurological test results (VPT, DN4 score, muscle strength and feet ESC) 4 years later.

Cross-sectional studies have already reported a relation between the sAF and microangiopathic complications such as retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes [10] as well as a relation with neuropathy defined by the presence of two or more signs or symptoms [17]. This relation was also found using another device that measures skin intrinsic fluorescence [18,19]. In the pioneer work of Meerwaldt *et al.*, including 13 patients with type 1 diabetes and 34 with type 2 diabetes, the relation between sAF and nerve conduction velocities was present even without the clinical manifestations of neuropathy, which suggests that altered sAF could precede them [20]. However, longitudinal studies provide stronger arguments for a causal relationship between sAF, as a marker of AGE accumulation and metabolic memory, and DPN, where high levels of tissue [21] or circulating [22] AGE are reported. To our knowledge, only one longitudinal study has been published, which involved 881 patients with type 2 diabetes, 7.5% of whom developed DPN as defined by diminished sensibility with 5.07/10 g monofilament during the three years following their sAF measurement [23]; the relation between sAF and the later development of neuropathy was significant after adjustment to the diabetes duration in this cohort, which is in accord with our results on type 1 diabetes. Furthermore, because DPN has heterogeneous manifestations that involve different nervous functions [2], we systematically assessed the sensitivity, pain, motor and autonomic function. To our knowledge, there is no evaluation of the link

between sAF and results from this combination of neurological tests.

In DPN, large myelinated fibre lesions contribute to the loss of foot sensitivity [2]. The loss of foot sensitivity can be measured by VPT which predicts foot ulceration [24,25]. For this measurement, the neurothesiometer has the advantage of providing a quantitative value to estimate the large nerve lesion severity. Consistent with our findings, cross-sectional studies found a relationship between the long-term glycemic control, reflected by the mean HbA_{1c} over more than 9 years, and the VPT or large fibre conduction [26]. Additionally, correlations were reported between the skin intrinsic fluorescence or the sAF and VPT [18–20]. In the present study, a difference of 10 V was found between the lowest and highest sAF quartiles, and the mean VPT was low (approximately 11 V) 4 years after the measurement of sAF, which corresponds to a moderately impaired VPT [24,25]. Despite this moderately high VPT value, the highest sAF quartile was independently associated with increased VPT. High sAF has already been reported in patients with foot ulcers, the main morbidity of DPN [27,28]. Our results show that even before reaching a VPT that reflects a severe lesion of a large nerve fibre or a high risk of foot ulcer, sAF reflects the worsening of large fibre function.

Pain can be among the first symptoms of DPN involving the intra-epidermal nerve fibre, unmyelinated fibre and small fibre function [2]. An experimental study showed that some AGE (Methylglyoxal) are implicated in the mechanism of hyperalgesia by increasing the electrical excitability of sensory neurons and slowing the nerve conduction [29]. The current study strengthens this result by suggesting that even before reaching the score threshold of ≥ 4 for the diagnosis of neuropathic pain, a higher tissue AGE as reflected by the sAF precedes a complaint related to pain.

Muscle weakness is a late complication of DPN with motor nerve involvement; however, the latter is unusual in DPN, especially in the upper limbs [2]. In addition to motor nerve function, sensory or autonomic nerve function could contribute to a loss of muscle strength [30]. However, mechanisms other than nerve lesion can also contribute to muscle weakness. The age-related accumulation of AGE in skeletal muscle, accelerated by diabetes, could also directly contribute to lower muscle strength [31]. sAF has been associated with muscle strength in elderly men or women [32,33]. Our results show that in a sample of middle-aged individuals with type 1 diabetes, an increase in the sAF is also associated with the loss of upper limb strength in women. This gender-specific effect could be explained by the fact that, in addition to the upper limb strength being lower compared with that of men, in this sample, the age of the women corresponded to the peri-menopausal period; in the process of organic change during this period, muscle strength could be

Skin Autofluorescence and Neuropathy

more sensitive to factors such as the accumulation of AGE [34].

Lesions of small fibres that innervate sweat glands have been shown to develop early in patients with DPN even when large myelinated fibre function is still normal [35]. The Sudoscan device provides quantitative measurements of the ESC, which allows an evaluation of the severity of the autonomic disorder [13,16,36]. In a previous study of neuropathy in type 1 diabetes, serum AGE (Carboxymethyllysine) were associated with lesions of small fibres that were evaluated by intra-epidermal nerve fibre density measured 10 years later [37]. Consistent with this result, we found that the highest quartile of sAF is associated with a lower ESC despite the normal sudomotor function of our sample with a mean ESC that is superior to the 70- μ S threshold [13,16]. This result shows that in type 1 diabetes, sAF is related to the worsening of ESC at an early time, which reflects early lesions of the small fibres.

Some limitations must be kept in mind. First, neuropathy was not systematically evaluated at inclusion. Our study can therefore not be considered as prospective. To our knowledge, no report has been published about the time course of sAF in patients with type 1 diabetes. The unique longitudinal study from Gerrits *et al.* included patients with recent type 2 diabetes [38], and their sAF was stable: baseline value at 2.71 ± 0.69 AU and 2.79 ± 0.77 AU three years later. Fourteen percent of our patients had signs of neuropathy at the 4-year follow-up, which is consistent with the incidence of clinically evident DPN in the Diabetes Control and Complications Trial study (respectively, 11% and 18% in the intensive and conventional treatment groups after an average of 6.5 years of follow-up) [39]. Moreover, a reverse causality appears unlikely because the accumulation of AGE is observed in the peripheral nerves and thought to have an important role in axonal damage and neuronal apoptosis [6]. Another limit is the absence of a nerve conduction study to confirm DPN. However, even if nerve conduction studies demonstrate normal large fibre function, small fibres are affected early in DPN. Therefore, for the diagnosis of subclinical neuropathy, the Toronto Expert panel Group recommends a small-fibre assessment [35] which we performed with the measurement of feet ESC [13].

To conclude, because DPN is irreversible, early detection at the subclinical stage is important to slow or stabilize the sensory deficit and to provide education for the prevention of foot ulcers. The simple and non-invasive screening of sAF among type 1 diabetic patients could be useful to select patients for early detection of neuropathy. During the last 20 years an important therapeutic advance was made regarding long term diabetic complications, principally cardiovascular morbidity and mortality. We see also a better therapeutic approach to patients with diabetic retinopathy, and there is presently a list of new

drugs in phase II and III dedicated to our patients with diabetic nephropathy. Although diabetic peripheral neuropathy is one of the most common complications that lead to great injury, our ability to treat these patients is still very poor. The positive association we find between the accumulation of AGEs and the signs of neuropathy four years later seems important and useful.

Acknowledgements

We would like to thank J.H. Calvet for providing the Sudoscan (ImpetoMedical, Paris, France).

Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Search terms

[14] All Clinical Neurology, [16] Clinical neurology examination, [283] All clinical neurophysiology, [153] Metabolic disease (inherited), [17] Prognosis

Author contributions

K Rajaobelina, conducted the analysis, wrote the original draft of the manuscript and interpreted the data.

B Farges, contributed to statistical analysis and data collection. S Nov, contributed to statistical analysis and data collection.

E Maury, helped to conceptualization of the study and data collection.

FL Cephise-Velayoudom, helped to interpret the data and provided significant advice.

H Gin, contributed to the design of the study, revised the manuscript and provided significant advice.

C Helmer, helped to statistical analysis, helped to interpret and revise the manuscript and provided significant advice.

V Rigalleau, conceived the idea for the study, helped to statistical analysis, to interpret the data and revised the manuscript.

Disclosure

K Rajaobelina, B Farges, S Nov, E Maury, FL Cephise-Velayoudom, H Gin, C Helmer, V Rigalleau, report no disclosures.

References

- Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, *et al.* The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993; **43**: 817–824.
- Said G. Diabetic neuropathy—a review. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; **3**: 331–340.
- Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacol Res* 2014; **80**: 21–35.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; **414**: 813–820.
- Pop-Busui R, Herman WH, Feldman EL, *et al.* DCCT and EDIC studies in type 1 diabetes: lessons for diabetic neuropathy regarding metabolic memory and natural history. *Curr Diab Rep* 2010; **10**: 276–282.
- Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res* 2012; **159**: 355–365.
- Monnier VM, Bautista O, Kenny D, *et al.* Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA_{1c} as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes* 1999; **48**: 870–880.
- Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, *et al.* Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2004; **47**: 1324–1330.
- Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Autofluorescence of skin advanced glycation end products: marker of metabolic memory in elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015; **70**: 841–846.
- Genevieve M, Vivot A, Gonzalez C, *et al.* Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2013; **39**: 349–354.
- Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther* 2010; **12**: 399–403.
- Gin H, Perlemoine C, Rigalleau V. How to better systematize the diagnosis of neuropathy? *Diabetes Metab* 2006; **32**: 367–372.
- Gin H, Baudoin R, Raffaitin CH, Rigalleau V, Gonzalez C. Non-invasive and quantitative assessment of sudomotor function for peripheral diabetic neuropathy evaluation. *Diabetes Metab* 2011; **37**: 527–532.
- Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, *et al.* Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 2005; **114**: 29–36.
- Gin H, Rigalleau V, Perlemoine C. Insulin therapy and body weight, body composition and muscular strength in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Metab* 2010; **2010**: Article ID 340570. DOI: 10.1155/2010/340570.
- Vinik AI, Nevoret M-L, Casellini C. The new age of sudomotor function testing: a sensitive and specific biomarker for diagnosis, estimation of severity, monitoring progression, and regression in response to intervention. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; **6**: 94.
- Araszkievicz A, Naskret D, Zozulinska-Ziolkiewicz D, *et al.* Skin autofluorescence is associated with carotid intima-media thickness, diabetic microangiopathy, and long-lasting metabolic control in type 1 diabetic patients. Results from Poznan Prospective Study. *Microvasc Res* 2015; **98**: 62–67.
- Conway BN, Aroda VR, Maynard JD, *et al.* Skin intrinsic fluorescence correlates with autonomic and distal symmetrical polyneuropathy in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011; **34**: 1000–1005.
- Orchard TJ, Lyons TJ, Cleary PA, *et al.* The association of skin intrinsic fluorescence with type 1 diabetes complications in the DCCT/EDIC study. *Diabetes Care* 2013; **36**: 3146–3153.
- Meerwaldt R, Links TP, Graaff R, *et al.* Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2005; **48**: 1637–1644.
- Sugimoto K, Nishizawa Y, Horiuchi S, Yagihashi S. Localization in human diabetic peripheral nerve of N(epsilon)-carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia* 1997; **40**: 1380–1387.
- Aubert CE, Michel P-L, Gillery P, *et al.* Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes: advanced glycation and neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2014; **30**: 679–685.
- Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, *et al.* Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care* 2008; **31**: 517–521.
- Gin H, Rigalleau V, Baillet L, Rabemanantsoa C. Comparison between monofilament, tuning fork and vibration perception tests for screening patients at risk of foot complication. *Diabetes Metab* 2002; **28**: 457–461.
- Young MJ, Breddy JL, Veves A, Boulton AJ. The prediction of diabetic neuropathic foot ulceration using vibration perception thresholds. A prospective study. *Diabetes Care* 1994; **17**: 557–560.
- Kullberg CE, Arnqvist HJ. Impaired vibration perception threshold and long-term mean HbA_{1c} in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996; **13**: 1027–1032.
- Hu H, Han C, Hu X, Ye W, Huang W, Smit AJ. Elevated skin autofluorescence is strongly associated with foot ulcers in patients with diabetes: a cross-sectional, observational study of Chinese subjects. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012; **13**: 372–377.
- Vouillarmet J, Maucort-Boulch D, Michon P, Thivolet C. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. *Diabetes Technol Ther* 2013; **15**: 601–605.
- Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, *et al.* Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med* 2012; **18**: 926–933.
- Kalyani RR, Metter EJ, Egan J, Golden SH, Ferrucci L. Hyperglycemia predicts persistently lower muscle strength with aging. *Diabetes Care* 2015; **38**: 82–90.
- Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; **103**: 2068–2076.
- Dalal M, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Fried LP, Semba RD. Elevated serum advanced glycation end products and poor grip strength in older community-dwelling women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; **64**: 132–137.
- Momma H, Niu K, Kobayashi Y, *et al.* Skin advanced glycation end product accumulation and muscle strength among adult men. *Eur J Appl Physiol* 2011; **111**: 1545–1552.
- Sipilä S, Poutamo J. Muscle performance, sex hormones and training in peri-menopausal and post-menopausal women. *Scand J Med Sci Sports* 2003; **13**: 19–25.
- Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, *et al.* Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010; **33**: 2285–2293.
- Smith AG, Lessard M, Reyna S, Doudova M, Singleton JR. The diagnostic utility of Sudoscan for distal symmetric peripheral neuropathy. *J Diabetes Complicat* 2014; **28**: 511–516.
- Sveen KA, Karimé B, Jørum E, *et al.* Small- and large-fiber neuropathy after

Skin Autofluorescence and Neuropathy

- 40 years of type 1 diabetes: associations with glycemic control and advanced protein glycation: the Oslo Study. *Diabetes Care* 2013; **36**: 3712–3717.
38. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, *et al*. Skin advanced glycation end product accumulation is poorly reflected by glycemic control in type 2 diabetic patients (ZODIAC-9). *J Diabetes Sci Technol* 2008; **4**: 572–7.
39. Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R, DCC/EDIC Research Group. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care* 2014; **37**: 31–38.

3.3 Progression de l'autofluorescence des AGE sur 4 ans de suivi chez des patients atteint d'un diabète de type 1 (article 3, en soumission)

3.3.1 Introduction

Les produits de glycation avancés jouent un rôle important dans les complications du diabète car ils modifient les protéines intracellulaires et les matrices extracellulaires et leur interaction avec leur récepteur RAGE active l'inflammation (14). Dans le diabète de type 1 des taux élevés d'AGE dans les biopsies cutanées ont été associés aux complications du diabète (167). Cependant, en pratique clinique il est peu envisageable de faire des mesures d'AGE à partir de biopsies cutanées répétées.

Il s'agit de la première étude mesurant à deux reprises l'AF à 4 ans d'intervalle. Cette étude permettra de mieux connaître la cinétique d'évolution de l'AF des AGE dans une population de patients atteints de diabète de type 1. Au-delà de l'aspect descriptif, dans cette étude nous sommes également intéressés aux déterminants de l'évolution de l'AF, en particulier au rôle de la pompe à insuline. Enfin, nous avons analysé les complications liées à cette évolution, en particulier le développement de la néphropathie diabétique.

3.3.2 Discussion

Cette étude est la première à décrire l'évolution de l'AF sur 4 ans chez des patients atteints de diabète de type 1. Globalement, l'AF augmente significativement au cours des 4 ans de suivi. Cependant, une diminution significative de l'AF a été observée chez 14,3 % des patients. Les caractéristiques recueillies à l'inclusion associées à la variation de l'AF sur 4 ans étaient la présence d'une insuffisance rénale modérée et le traitement par pompe à insuline chez les patients qui n'ont pas de déficience rénale. L'augmentation de l'AF a été associée à la survenue de la microalbuminurie et à la survenue d'une insuffisance rénale modérée après 4 ans de suivi.

Ces résultats soulèvent l'hypothèse qu'une réduction de l'accumulation des AGE pourrait améliorer l'issue des complications diabétiques. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment la pompe à insuline peut prévenir l'augmentation de l'AF.

En conclusion, chez nos patients atteints d'un diabète de type 1, l'AF des AGE augmente avec la présence de néphropathie mais la diminution de l'AF est associée au traitement par pompe à insuline. L'évolution de l'AF sur 4 ans est associée au développement de la microalbuminurie et à la diminution du DFG.

**Progression of skin autofluorescence of AGEs over 4 years
in patients with type 1 diabetes.**

Short running title: Skin autofluorescence in type 1 diabetes

Authors:

Kalina Rajaobelina^{2,3}, MPH, Catherine Helmer^{2,3}, MD, PhD, Fritz-Line Vélayoudom-Céphise^{1,4}, MD PhD, Sovannpany Nov², MPH, Blandine Farges¹, MD, Emilie Pupier¹, MD, Laurence Blanco¹, MD, Marie Hugo¹, MD, Henri Gin¹, MD, PhD, Vincent Rigalleau^{1,2,3}, MD, PhD.

1. Nutrition Diabetology Unit, CHU Bordeaux, Haut Lévêque Hospital, Pessac, France.
2. INSERM, Unit 1219 - Bordeaux Population Health Research Center, F-33000 Bordeaux, France.
3. University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.
4. Research Group Clinical Epidemiology and Medicine ECM/L.A.M.I.A EA 4540. University Hospital of Guadeloupe University of Antilles, Guadeloupe, France

Word count: 2460

Abstract : 243

One figure, 3 tables

Corresponding author: Kalina Rajaobelina

INSERM, Unit 1219 - Bordeaux Population Health Research Center ; University of Bordeaux

146 rue Léo Saignat, 33 076 BORDEAUX CEDEX, FRANCE

tel: (33) 5 57 57 15 96 fax: (33) 5 57 57 14 86

E-mail: Kalina.Rajaobelina@isped.u-bordeaux2.fr

Abstract:

Objectives

The deposit of Advanced Glycation End-products (AGEs) is involved in diabetic complications. It can be evaluated by measuring the skin autofluorescence (sAF). We searched whether sAF progressed over 4 years in Type 1 Diabetes, and analysed its relationship with the development of nephropathy.

Research design & methods

Two measurements of sAF was realized on 154 patients during years 2009 and 2013. Baseline factors associated to the progression of sAF were analyzed by multivariate regression analysis. The relations between sAF progression, microalbuminuria and impaired eGFR were analyzed by logistic regression analysis.

Results

The patients were 51 ± 16 years old, with duration of diabetes of 23 ± 13 years, HbA1c: $7.7 \pm 1.0\%$, 20.7% were treated by Continuous Sub-cutaneous Insulin Infusion (CSII).

The sAF progressed by +18.1% over 4 years. Two interacting ($p=0.04$) variables were associated with the later progression of sAF: mildly impaired eGFR and treatment by CSII. The patients with mildly impaired eGFR had the highest progression of sAF (+11.5 % $p=0.01$). CSII was associated with a reduced progression of sAF in patients without kidney impairment ($\beta = -17.2\%$, $p=0.01$). A +10% progression of sAF during the follow-up was associated with more microalbuminuria: OR = 1.45, $p=0.02$ and more mildly impaired eGFR (<90 mL/min/ 1.73m^2): OR 1.22, $p=0.03$ at 4 years of follow-up.

Conclusions

The sAF of AGEs progresses in patients with type 1 diabetes, more if they have diabetic nephropathy, less if they are treated by CSII. This progression is associated with the development of nephropathy.

INTRODUCTION

Advanced Glycation Endproducts (AGEs) generated from intracellular glucose play an important role in diabetic complications, as they alter intracellular proteins, modify extracellular matrix, and interact with receptors RAGE that promote inflammation (14). High levels of AGEs accumulated in skin biopsies have been related to later complications in Type 1 diabetes (167). However, skin biopsies can hardly be repeated and little is known about the kinetics of AGEs accumulation.

The fluorescent property of many AGEs allows an indirect, simple and safe estimation of their accumulation by measuring the skin autofluorescence sAF (11) or intrinsic fluorescence (168). The sAF is well correlated to the AGE concentrations in skin biopsies (11). In the general elderly population, the sAF is related to renal function and ancient glucose levels, 10 years before sAF measurement, which suggests that it may be a marker of metabolic memory (169). In subjects with type 2 diabetes, it predicts later microangiopathy (170) and macrovascular event (171). In type 1 diabetes, cross sectional studies have shown that sAF is associated to age, long term glucose control, and renal function (158,172). However, the longstanding time course of sAF in type 1 diabetes has not been studied yet. Does it increase? Can it decline in some patients? What are its determinants? Does it relate to the development of complications?

In 240 patients with type 1 diabetes, we measured sAF during year 2009 (158). One hundred and fifty four patients had a second sAF measurement four year later. We analyzed the relationship between the progression of sAF and their modality of treatment (Constant Subcutaneous Insulin Infusion CSII vs Multiple Daily Injections), and renal outcomes.

RESEARCH DESIGN AND METHOD

Study population

We included patients with type 1 diabetes followed at the Nutrition-Diabetology unit of the University Hospital Haut-Levêque (Bordeaux, France) (158). This study started in 2009 and included 240 adults with type 1 diabetes (age ≥ 18 years). At baseline in 2009, their sAF was measured, and the general and clinical characteristics were recorded. Written informed

consent was obtained for all participants, and the study was approved by the local ethic committee.

At follow-up, 4 years after the baseline examination, a second measurement of sAF and clinical examination for diabetes complications were realized. Among the 240 patients who were included at baseline, 221 were seen 4 years later in 2013 (13 were lost to follow-up and 6 died), and a second measurement of sAF could be performed on 158 participants among them 154 also had final assessment of eGFR constituting the main study sample (and 143 final assessment of the albumin excretion rate (AER)).

Skin autofluorescence measurement

The accumulation of AGE in skin was measured at baseline and at 4 year follow-up with an AGE reader (DiagnOpticsBV, Groningen, the Netherlands) and expressed in arbitrary units (AU) (11). The measurement was performed at a normal skin site without scars, lichenification or other abnormalities. The Fitzpatrick phototypes V and VI were not evaluated due to their skin pigmentation, which has ultraviolet reflectance of <10%.

Clinical data

The data collection included age, gender, BMI, diabetes duration, smoking, HbA1c, treatment by CSII, renin-angiotensin inhibitors. AER and eGFR (EPI-CKD formula) were measured at baseline and follow-up.

Statistical analysis

Student tests for paired values were used to test the evolution of sAF between baseline and the 4-year follow-up. The change of sAF over the 4-year period was defined by the percentage of relative variation: $((\text{sAF at 4 yrs follow up} - \text{baseline sAF}) / \text{baseline sAF}) \times 100$. We also compared the characteristics of sAF decliners to non-decliners.

We performed both multivariate linear models (for the % sAF variation) and logistic regression models (for sAF decliners vs others) to identify the baseline factors associated to the progression of sAF. Due to the strong effect of renal insufficiency on sAF (173) we tested whether Kidney impairment (impaired eGFR < 90ml/min/1.73m² and/or abnormal Albumin Excretion Rate >30 mg/24H) (174) could modify the effect of the baseline factors on the progression of sAF. In case of significant interaction the analysis was stratified.

The relation between the progression of sAF and nephropathy at the end of the follow-up was analyzed by logistic regression adjusted on baseline characteristics: age, eGFR, albuminuria, diabetes duration, use of the renin angiotensin system drugs and CSII at baseline. We distinguished two phenotypes of nephropathy: mildly impaired eGFR (eGFR < 90ml/min/1.73m²) and abnormal Albumin Excretion Rate > 30 mg/24H).

RESULTS

Population (Table 1)

The study sample included 154 patients (92 men) with a mean age of 51±15 years. Diabetes duration was 23±13 years and mean Hba1c was 7.7±1.0%, 20.8% were treated by CSII.

Progression of sAF (Figure)

sAF increased from 2.13±0.56 AU to 2.48±0.68 AU (p <0.0001), which corresponds to a mean relative variation of +18.1%. A reduction of sAF was observed in 22 patients (14.3%): their sAF decreased from 2.53±0.64 AU at baseline to 2.18±0.58 AU four years later. At the inclusion the mean sAF of these 22 patients was higher compared to those whose sAF worsened (2.53±0.64 vs 2.07±0.52 AU, p = 0.0003) but four years later their sAF became lower (2.18±0.58 vs 2.53±0.69 AU, p = 0.02).

Association between baseline factors and progression of sAF (Table 2)

Among baseline variables, the only one associated with progression of sAF was eGFR, the patients with a mildly impaired eGFR (< 90 ml/min/1.73m²) having the highest progression of sAF (+11.5 %, p=0.01). However, we found a significant interaction between treatment by CSII and the presence of a kidney impairment (p = 0.04). Consequently, we stratified the analysis according to the presence of kidney impairment. In those without kidney impairment (n = 65), the treatment by CSII at baseline was significantly associated to the variation of sAF: sAF of patients with CSII decreased by - 17.1% (p=0.01 vs patients without CSII).

Association between progression of sAF and final kidney status (Table 3)

Twenty-two participants had microalbuminuria (>30 mg/24H) after four years. After multivariate adjustment, a 10% increase of sAF over 4 years was associated to a 1.45 higher

risk of microalbuminuria at follow-up ($p < 0.05$). The other factors associated to the presence of microalbuminuria at follow-up were age (OR = 1.07, IC95% = 1.02 - 1.14, $p = 0.01$), and baseline microalbuminuria (OR = 43.67, IC95% = 7.96 - 239.54, $p < 0.0001$). When participants with baseline microalbuminuria were excluded ($n=20$), a 10% increase of sAF over 4 years was still significantly associated to a higher risk of microalbuminuria at follow-up (OR = 1.61 for, IC 95% = 1.06-2.43, $p < 0.05$).

Sixty-nine participants had a mildly impaired eGFR (< 90 mL/min/1.73m²) after four years. After multivariate adjustment, a 10% increase of sAF over 4 years was associated to a 1.22 higher risk of impaired eGFR at follow-up ($p < 0.05$). The other factors associated to an impaired eGFR at follow-up were age (OR = 1.04, IC 95% = 1.00 - 1.08, $p < 0.05$) and eGFR at baseline (OR = 0.74 for +10 ml/min/1.73m² eGFR, IC 95% = 0.58 - 0.94, $p < 0.05$). When participants with baseline impaired eGFR were excluded ($n = 82$), a 10% increase of sAF was still associated to a higher risk of having an eGFR lower than the optimum range at follow-up (OR = 1.56, IC 95% = 1.07-2.29, $p < 0.05$).

CONCLUSIONS

Our study is the first to describe the change of sAF over 4 years in patients with type 1 diabetes. During this period, sAF increased significantly, although a significant decrease was observed for 22/154 (14.3%) of the patients. Two baseline characteristics of the patients were related to the later variation of sAF: 1) the presence of mildly impaired eGFR, 2) the treatment by CSII in patients without kidney impairment. At the end of the follow-up, the increase of sAF was related to more frequent microalbuminuria (> 30 mg/24H) and to mildly impaired eGFR (< 90 ml/min/1.73m²), which was still significant after adjustment for usual predictors of diabetic nephropathy.

In our study, the mean variation of sAF was +18.1 % over 4 years ($p < 0.001$) The natural progression of sAF has not been studied in the general population, but the cross sectional study from Koetsier et al depicts that sAF increases with age (36), as expected because the accumulation of AGEs is thought to participate to the aging process (13). This age-dependent increase is slow, $\sim +1\%/year$, so it cannot explain the higher values after four years in our patients. The unique longitudinal study from Gerrits et al included patients with recent type 2 Diabetes (175), and the authors did not mention a significant progression of sAF after three years: baseline value at 2.71 ± 0.69 AU and 2.79 ± 0.77 AU three years later. In these patients, the final sAF was weakly related to the glucose control ($r=0.069$) and to the serum

creatinine after adjustment to the baseline sAF. The progression of sAF has not been longitudinally studied in type 1 diabetes, but cross sectional studies have shown that sAF relates more to the former than the present glucose control of these patients (158,176,177), and the relation is not strong: in the DCCT-EDIC, the time-weighted mean HbA1c only contributed to 4.5% of the variance of the skin intrinsic fluorescence (153). The higher HbA1c in our patients with type 1 diabetes probably contributed to their more progressive sAF as compared to the well-controlled subjects with type 2 diabetes in the study from Gerrits et al (175).

The first determinant of the progression of sAF in our patients was their initial mildly impaired eGFR, in line with the association between initial creatinine and follow-up sAF in T2D as shown by Gerrits et al.(175). Independent of diabetes, the sAF is well-known to increase with the duration, the stage and the progression of chronic kidney disease (CKD) (178–180). We have recently shown that sAF is related to the eGFR measured ten years before in elderly subjects from the general population (169), and it is increased in patients with T2D and CKD (180). In type 1 diabetes, cross-sectional studies have shown associations of AER and estimated GFR with sAF (158,177). The reduced clearance of the precursors of AGEs presumably favors their accumulation (12).

In our patients free of kidney damage, the progression of sAF was reduced with CSII, and this modality of treatment was highly represented (36%) in the patients whose sAF declined. As sAF is known to increase with age, we did not expect that it could decline by -14% after four years in some patients, which is much more than the 5% variability of sAF (181). A reduction of sAF has been reported in a few patients 16 months after renal transplantation (182), which confirms that it is possible and meaningful. In the DCCT study, the level of AGEs in skin biopsies was lower in the intensive therapy group who often used CSII, as compared to the conventional arm (170). Patients on CSII have slower progression to microalbuminuria (183) and lower rates of cardiovascular events (184). Our results raise the hypothesis that a reduced accumulation of AGEs may play a role in these better outcomes. Further research will be required to explain how CSII may help prevent the rise of sAF. Glucose levels are less variable on CSII (185), which reduces oxidative stress (186), however, sAF does not seem to relate to glucose variability (187). The use of insulin pump is also an indicator of the motivation, willingness, capability and compliance of the patients (184), which may indirectly influence the long term deposit of AGEs.

Our study is the first to relate the progression of the sAF with the progression of kidney damage in diabetes: as shown in the table 3, a +10% increase of sAF was related to a

higher rate of microalbuminuria or mildly impaired eGFR at the end of the follow-up, adjusted for age, duration of diabetes, HbA1c, arterial hypertension, treatment by CSII, and to the initial renal status. In type 1 diabetes, the concentration of AGEs in skin biopsies is associated to 17 years later nephropathy (167). The link between AGEs and kidney seems strong and is a two-way relationship, which may explain the absence of relation between CSII and change of sAF in patients with initial renal impairment. The first way is that similarly to other tissues, the kidney is subject to accumulation of AGEs. Therefore, AGEs alter the structural tissue by cross-linking of matrix molecules such as collagen and indirectly alter the cell signaling binding to their receptor RAGE (14). Serum levels of AGEs are increased in normoalbuminuric type 1 diabetes patients with fast progression of glomerular basement membrane thickening (188). The second way is conversely: the loss of AGEs clearance accelerates the accumulation conducting in a vicious cycle (12).

Our study has some limitations. The limited number of patients may explain why we could not detect an improved renal outcome in the patients whose sAF declined during the follow-up. Because we did not measure glucose variability, neither oxidative stress nor the educational level of our patients, we can only draw hypotheses about the relation between the treatment with CSII and the decline of sAF in some patients. Further studies will be necessary to search whether the progression of sAF may be associated with other complications as retinopathy, neuropathy or macroangiopathy.

In conclusion, the skin autofluorescence of AGEs progresses in patients with type 1 diabetes, more if they have diabetic nephropathy, less if they are treated by CSII. This progression is associated with the development of microalbuminuria and the decline of eGFR.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.R analyse the data and wrote the manuscript. C.H reviewed the manuscript. B.F, E.P, L.B, M.H, H.G researched data. VR contributed to write and review manuscript.

References

1. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813–20.
2. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3103–11.
3. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Sep 22];47(7). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-004-1451-2>
4. Orchard TJ, Lyons TJ, Cleary PA, Braffett BH, Maynard J, Cowie C, et al. The Association of Skin Intrinsic Fluorescence With Type 1 Diabetes Complications in the DCCT/EDIC Study. *Diabetes Care*. 2013 Oct 1;36(10):3146–53.
5. Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products: Marker of Metabolic Memory in Elderly Population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015 Jul 1;70(7):841–6.
6. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, Graaff R, Groenier KH, Smit AJ, et al. Skin Autofluorescence: A tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care*. 2008 Mar 1;31(3):517–21.
7. Lutgers HL, Gerrits EG, Graaff R, Links TP, Sluiter WJ, Gans RO, et al. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009 May;52(5):789–97.
8. Genevieve M, Vivot A, Gonzalez C, Raffaitin C, Barberger-Gateau P, Gin H, et al. Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 2013 Sep;39(4):349–54.
9. Sugisawa E, Miura J, Iwamoto Y, Uchigata Y. Skin Autofluorescence Reflects Integration of Past Long-Term Glycemic Control in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Aug 1;36(8):2339–45.
10. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005 Dec;16(12):3687–93.
11. Nelson RG, Tuttle KR. The New KDOQITM Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and CKD. *Blood Purif*. 2006 Dec 14;25(1):112–4.

12. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther.* 2010 May;12(5):399–403.
13. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010 Sep 1;65A(9):963–75.
14. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, Groenier KH, Smit AJ, Gans RO, et al. Skin advanced glycation end product accumulation is poorly reflected by glycemic control in type 2 diabetic patients (ZODIAC-9) 1, Lutgers HL, Kleefstra N, Groenier KH, Smit AJ, Gans RO, Bilo HJ. *J Diabetes Sci Technol.* 2008 Jul;572–7.
15. Aroda VR, Conway BN, Fernandez SJ, Matter NI, Maynard JD, Orchard TJ, et al. Cross-Sectional Evaluation of Noninvasively Detected Skin Intrinsic Fluorescence and Mean Hemoglobin A1c in Type 1 Diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2013 Feb;15(2):117–23.
16. Chabroux S, Canouï-Poitrine F, Reffet S, Mills-Joncour G, Morelon E, Colin C, et al. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. *Diabetes Metab.* 2010 Apr;36(2):152–7.
17. Cleary PA, Braffett BH, Orchard T, Lyons TJ, Maynard J, Cowie C, et al. Clinical and Technical Factors Associated with Skin Intrinsic Fluorescence in Subjects with Type 1 Diabetes from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. *Diabetes Technol Ther.* 2013 Jun;15(6):466–74.
18. Oleniuc M, Schiller A, Secara I, Onofriescu M, Hogas S, Apetrii M, et al. Evaluation of advanced glycation end products accumulation, using skin autofluorescence, in CKD and dialysis patients. *Int Urol Nephrol.* 2012 Oct;44(5):1441–9.
19. Tanaka K, Nakayama M, Kanno M, Kimura H, Watanabe K, Tani Y, et al. Skin Autofluorescence Is Associated with the Progression of Chronic Kidney Disease: A Prospective Observational Study. James LR, editor. *PLoS ONE.* 2013 Dec 12;8(12):e83799.
20. Rigalleau V, Cougnard-Gregoire A, Nov S, Gonzalez C, Maury E, Lorrain S, et al. Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2015 Mar;29(2):270–4.
21. Busch M, Franke S, Rüster C, Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney: AGEs AND KIDNEY. *Eur J Clin Invest.* 2010 Jul 9;40(8):742–55.
22. Mulder DJ, Water TVD, Lutgers HL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, et al. Skin Autofluorescence, a Novel Marker for Glycemic and Oxidative Stress-Derived Advanced Glycation Endproducts: An Overview of Current Clinical Studies, Evidence, and Limitations. *Diabetes Technol Ther.* 2006 Oct;8(5):523–35.
23. Crowley LE, Johnson CP, McIntyre N, Fluck RJ, McIntyre CW, Taal MW, et al. Tissue Advanced Glycation End Product Deposition after Kidney Transplantation. *Nephron Clin Pract.* 2013;124(1-2):54–9.

24. Rosenlund S, Hansen TW, Andersen S, Rossing P. Effect of 4 years subcutaneous insulin infusion treatment on albuminuria, kidney function and HbA_{1c} compared with multiple daily injections: a longitudinal follow-up study. *Diabet Med*. 2015 Nov;32(11):1445–52.
25. Steineck I, Cederholm J, Eliasson B, Rawshani A, Eeg-Olofsson K, Svensson A-M, et al. Insulin pump therapy, multiple daily injections, and cardiovascular mortality in 18 168 people with type 1 diabetes: observational study. *BMJ*. 2015 Jun 22;350(jun21):h3234–h3234.
26. Tumminia A, Crimi S, Sciacca L, Buscema M, Frittitta L, Squatrito S, et al. Efficacy of real-time continuous glucose monitoring on glycaemic control and glucose variability in type 1 diabetic patients treated with either insulin pumps or multiple insulin injection therapy: a randomized controlled crossover trial. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015 Jan;31(1):61–8.
27. Saisho Y. Glycemic variability and oxidative stress: a link between diabetes and cardiovascular disease? *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):18381–406.
28. Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PHN, Brouwer T, Jager J, Castro Cabezas M, et al. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study: Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications. *Diabet Med*. 2012 Dec;29(12):1556–61.
29. Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, Miller ME, Rich SS, Mauer M. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care*. 2013 Oct;36(10):3234–9.

Table 1. Baseline characteristics of the patients (n=154)

Baseline characteristics†		
Age (yrs)	51.32	(15.63)
Gender (Men)	92	59.74
BMI (kg/m ²)	25.09	(3.89)
Smoking	44	(28.57)
HbA1c (% ; mmol/mol)	7.70/61	(1.02)/(6.32)
Diabetes duration (yrs)	23.29	(13.50)
Treatment by CSII	32	(20.78)
Treatment by RAS-inhibitors	71	(46.10)
eGFR	88.25	(24.55)
AER ≥30 mg/24h	23	(14.94)
sAF	2.13	(0.56)

Abbreviations : AER = Albumin excretion rate; BMI = Body mass index; eGFR = Estimated glomerular filtration rate; sAF = Skin autofluorescence; RAS medication = Renin Angiotensin System medication.

†Mean (SD) or n (%) when appropriate

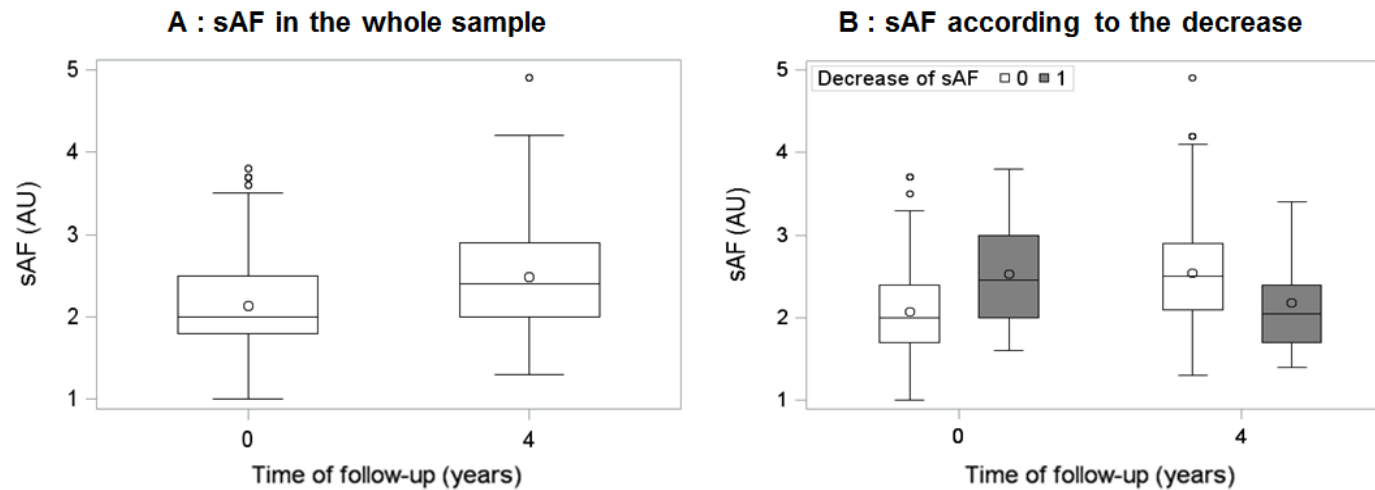


Figure 1. Levels of sAF at inclusion and at 4 years of follow-up in the main sample (n=154). Distributions of sAF at each time point were shown by box plot. The bottom and top of the box indicate the intra-quartile range. That is the range of values between the first and third quartiles (the 25th and 75th percentiles). The circle inside the box indicates the mean value. The line inside the box indicates the median value. The upper and lower horizontal bars indicate the maximum and minimum values excluding outliers. Circles indicate outliers.

A: At each time point distribution of sAF in the whole sample. sAF increased significantly from 2.13 ± 0.56 AU at baseline to 2.48 ± 0.68 AU at follow-up ($p > 0.0001$). **B:** A significant decrease of sAF was observed in 22 patients (14.3%). The sAF decreased from 2.53 ± 0.64 AU at baseline to 2.18 ± 0.58 AU at follow-up ($p < 0.0001$). In patients with an sAF decrease, at inclusion the mean sAF was higher compared to those where the sAF worsened (2.53 ± 0.64 vs 2.07 ± 0.52 AU, $p = 0.0003$) but at follow-up, their sAF has become lower compared to those where the sAF worsened (2.18 ± 0.58 vs 2.53 ± 0.69 AU, $p = 0.02$).

Table 2. Factors associated with change of sAF 4 years later (n = 154)

Change of sAF	Whole sample			Kidney impairment at baseline †					
	β	IC 95% n =154	p	No			Yes		
				β	IC 95% n = 65	p	β	IC 95% n = 89	p
Variation									
Age	-0.23	(-0.55 ; 0.10)	0.17	-0.10	(-0.58 ; 0.39)	0.69	-0.18	(-0.59 ; 0.22)	0.37
Diabetes duration	0.11	(-0.22 ; 0.45)	0.51	-0.13	(-0.61 ; 0.34)	0.57	0.35	(-0.13 ; 0.82)	0.16
Gender	-5.47	(-13.34 ; 2.39)	0.17	-1.45	(-12.59 ; 9.69)	0.80	-6.35	(-17.55 ; 4.84)	0.26
BMI	0.40	(-0.58 ; 1.39)	0.42	-0.72	(-2.33 ; 0.88)	0.37	0.83	(-0.43 ; 2.10)	0.19
Smoking	-0.13	(-2.72 ; 2.46)	0.92	-0.70	(-4.25 ; 2.84)	0.69	0.05	(-3.75 ; 3.85)	0.98
HbA1c	1.54	(-2.14 ; 5.22)	0.41	3.08	(-1.96 ; 8.12)	0.23	1.14	(-4.13 ; 6.41)	0.67
eGFR < 90 ml/min/1.73m ²	11.50	(20.03 ; 2.97)	0.01	-	-	-	-	-	-
AER ≥30 mg/24h	4.99	(-6.13 ; 16.11)	0.38	-	-	-	-	-	-
Treatment by CSII	-6.03	(-15.56 ; 3.49)	0.21	-17.20	(-30.67 ; -3.73)	0.01	1.86	(-11.31 ; 15.03)	0.78
Treatment by RAS inhibitors	1.16	(-7.29 ; 9.60)	0.79	-0.08	(-12.67 ; 12.52)	0.99	-0.27	(-11.55 ; 11.02)	0.96

Abbreviations : AER = Albumin excretion rate; BMI = Body mass index; eGFR = Estimated glomerular filtration rate; sAF = Skin autofluorescence; RAS medication = Renin Angiotensin System medication.

† eGFR < 90 ml/min/1.73m² and/or AER ≥ 30mg/24h at baseline. Interaction between kidney impairment and treatment by CSII, p = 0.04

Table 3. Multivariate association between change of sAF and renal status

	At 4 year follow-up					
	Microalbuminuria (≥ 30 mg/24H) *			eGFR < 90 mL/min/1.73 m ² §		
	OR	IC	p	OR	IC	p
10% increase of sAF	1.45	(1.05 ; 2.00)	0.02	1.22	(1.02 ; 1.46)	0.03
Age	1.08	(1.02 ; 1.14)	0.01	1.04	(1.00 ; 1.08)	0.03
Sexe	1.58	(0.39 ; 6.46)	0.52	1.14	(0.51 ; 2.58)	0.75
Diabetes duration	0.97	(0.91 ; 1.02)	0.23	1.01	(0.98 ; 1.05)	0.42
Bmi	0.97	(0.82 ; 1.14)	0.72	1.01	(0.91 ; 1.12)	0.87
Smoker	0.98	(0.62 ; 1.54)	0.92	1.16	(0.88 ; 1.53)	0.28
Hba1c	1.18	(0.70 ; 1.99)	0.54	1.14	(0.77 ; 1.70)	0.51
eGFR	1.01	(0.98 ; 1.04)	0.53	0.97	(0.95 ; 0.99)	0.01
Microalbuminuria at inclusion	43.67	(7.96 ; 239.54)	< 0.0001	0.54	(0.16 ; 1.89)	0.34
Treatment by CSII	4.44	(0.97 ; 20.27)	0.05	1.64	(0.62 ; 4.33)	0.32
Treatment by RAS inhibitors	2.59	(0.58 ; 11.62)	0.22	0.85	(0.36 ; 2.02)	0.72

Abbreviations : eGFR = Estimated glomerular filtration rate; sAF = Skin autofluorescence; RAS medication = Renin Angiotensin System medication. *n=143, §n=

4 PARTIE 4 : DISCUSSION

4.1 Résultats principaux et mise en perspective avec la littérature

Dans cette thèse, nous avons montré que la mesure d'AF cutanée des AGE pouvait refléter le passé métabolique dans une grande cohorte de personnes âgées de la population générale. L'AF cutanée était associée à un diabète ou à une maladie rénale chronique datant d'au moins 10 ans, mais pas à un diabète ou une maladie rénale chronique récents. De façon parallèle, l'AF était associée à l'HbA1c et à la glycémie 10 ans auparavant. De plus, l'AF était associée à la fonction rénale 10 ans auparavant et à la fonction rénale concomitante à la mesure.

Parallèlement, sur un suivi de 4 ans, nous avons montré que l'AF pouvait avoir une valeur prédictive pour les complications du diabète, en particulier la neuropathie périphérique et la néphropathie diabétique. En effet, l'AF était associée à la neuropathie 4 ans plus tard mais également aux tests neurologiques. Cette étude était la première étude prospective menée chez des patients diabétiques de type 1 avec deux mesures d'AF. Nous avons par ailleurs décrit pour la première fois l'évolution de la mesure d'AF sur 4 ans. Globalement, l'AF augmentait significativement au cours du suivi. Cependant, de manière inattendue on observait chez certains patients une diminution de l'AF, correspondant à une amélioration chez ces patients. Les facteurs recueillis à l'inclusion associés à la variation de l'AF étaient la fonction rénale et le traitement par pompe à insuline. Enfin, cette étude montre que la variation de l'AF pourrait avoir une valeur prédictive pour l'apparition de la néphropathie.

Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature. En effet, plusieurs études ont montré une association d'une part entre l'AF et le passé métabolique, et d'autre part entre l'AF et les complications du diabète.

Autofluorescence cutanée et mémoire métabolique

Dans la littérature nos résultats sont les premiers à évaluer la valeur de l'AF en tant que marqueur de mémoire métabolique en population générale âgée (189).

Dans le diabète de type 1, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'AF ou de l'autofluorescence intrinsèque (une autre méthode de mesure de l'accumulation des AGE) avec la durée du diabète (11,158,172,176,177,190). Dans le diabète de type 2 où il est moins aisé de dater l'apparition du diabète, certaines études ont associé l'AF à la durée du diabète (11,191). Néanmoins, toutes les études ne confirment pas cette association (175,192).

Plusieurs travaux ont montré une association entre l'AF et le contrôle métabolique passé en mesurant l'HbA1c qui reflète le contrôle métabolique sur les 3 derniers mois. Dans notre équipe, chez des patients diabétiques de type 1 nous avons montré que l'AF est liée au contrôle glycémique à long terme. En effet, après ajustements sur l'âge et le DFG, l'AF était liée à la moyenne des cinq dernières HbA1c ($\beta = 0,10$ pour une augmentation d'1% de l'HbA1c, $p = 0,005$) et des dix dernières HbA1c ($\beta = 0,13$ pour une augmentation de 1% de l'HbA1c, $p = 0,001$) (158). D'autres études ont montré une association entre l'AF et la moyenne des HbA1c jusqu'à 15 ans avant la mesure d'AF (11,172,176,190).

La fonction rénale joue un rôle clé dans l'accumulation des AGE au cours du temps. Notre équipe a rapporté une association entre l'AF et la maladie rénale dans le diabète de type 1 (193) et dans le diabète de type 2 (180). D'autres études montrent une augmentation significative de l'AF avec la sévérité de la maladie rénale chronique (172,177,194). Des patients ayant une maladie rénale chronique en phase 3 (194), en phase terminale ou sous dialyse ont une AF plus élevée (195,196). De plus, il a été montré que l'AF pourrait être un prédicteur fort et indépendant de la progression de la maladie rénale chronique (179). La transplantation rénale réduit mais ne normalise pas l'AF (197). Une étude chez 302 patients ayant eu une transplantation rénale montre qu'un niveau élevé d'AF était associé à un risque plus élevé (HR = 2,40) de rejet de la transplantation sur 5,2 ans (198). De plus, chez les patients dialysés, l'AF serait un prédicteur de la mortalité sur 3 ans (152,199) et de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires (200). Par conséquent, l'AF a été proposée pour être utilisée dans l'identification et le suivi des patients à risque de rejet de transplantation rénale et à risque de complications cardiovasculaires (201).

Autofluorescence cutanée des AGE et complications microvasculaires du diabète

Dans la littérature, les études longitudinales ayant évalué la relation entre l'AF et les complications microvasculaires du diabète sont rares. Dans le diabète de type 1, les travaux de notre équipe ont montré une association transversale entre l'AF et la présence d'une rétinopathie diabétique, d'une micro- ou macroalbuminurie et d'une réduction du DFG (158). Des résultats similaires ont été trouvés par Sugisawa et al. avec une association significative entre l'AF et la neuropathie diabétique et la rétinopathie (172). Chabroux et al. ont également trouvé une association entre l'AF et la néphropathie et la neuropathie, mais pas la rétinopathie (177). Dans une autre étude transversale ayant utilisé la fluorescence intrinsèque, l'augmentation de cette dernière était associée à une probabilité plus élevée de neuropathie autonome (202). Dans une population mixte de patients porteurs de diabète de type 1 et de diabète de type 2 Meerwaldt et al. ont montré que l'AF augmentait avec la sévérité de la

neuropathie périphérique ou autonome même à des stades infracliniques (203). La seule étude prospective sur la relation entre l'AF et les complications microvasculaires du diabète a été réalisée chez des patients atteints d'un diabète de type 2. Les résultats de cette étude montrent que chez 881 patients ayant un bon contrôle glycémique (HbA1c moyenne = 6,6%) suivis en moyenne pendant 3,1 ans, l'AF serait un prédicteur du développement des complications microvasculaires (OR= 2,05, $p > 0,001$) en particulier la neuropathie et la néphropathie mais pas la rétinopathie (170).

Chez des patients atteints d'un diabète de type 2 et de complications microvasculaires et macrovasculaires, l'AF était plus élevée (moyenne : 3,12 UA) que chez ceux qui avaient uniquement des complications microvasculaires (2,71 UA) ou aucune complication (2,57 UA ; $p < 0,001$). De même, chez les patients ayant une seule complication macrovasculaire, l'AF était plus élevée (2,91 UA) par rapport à ceux qui n'avaient pas de complication (187).

Autofluorescence cutanée des AGE, complications macrovasculaires du diabète et mortalité

Dans notre cohorte de patients atteints de diabète de type 1, nous avons également montré que l'AF était associée au risque incident d'événements macrovasculaires définis par un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral, une gangrène, une revascularisation des coronaires, des carotides ou des artères des membres inférieurs (193). L'AF a aussi été corrélée aux dommages vasculaires précoces comme la rigidité vasculaire, l'épaississement de l'intima-média et l'athérosclérose (204). L'AF a été corrélée à la rigidité vasculaire chez les personnes en bonne santé (195,205), chez les patients ayant un diabète de type 1 (206) ainsi que chez des patients ayant un pontage coronarien (207). Chez des personnes en bonne santé et non fumeuses, l'AF a été associée à l'épaississement de l'intima-média (208). L'AF était élevée chez les sujets ayant une sténose carotidienne et elle l'est d'autant plus avec la présence additionnelle d'une maladie artérielle périphérique (209). L'AF était aussi plus élevée chez les personnes ayant d'une maladie artérielle périphérique par rapport à celles qui en étaient indemnes (2,77 vs 2,44 AU ; $p < 0,001$). (49) Chez 252 patients ayant une maladie artérielle périphérique, l'AF était indépendamment associée à la mortalité toutes causes et aux événements cardiovasculaires sur 5 ans (210). Chez les patients atteints d'un diabète de type 1, l'AF était associée à la calcification des artères coronaires (211) et à un risque plus élevé de maladie coronaire (OR= 3,5 $p < 0,0001$) (211). Pour les patients atteints de diabète de type 2, Lutgers et al. ont montré que l'ajout de la mesure d'AF dans le calcul du score de risque cardiovasculaire de l'étude United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) améliorait la stratification des groupes (171). Chez les patients ayant un diabète ($n=48$ type 1 ; $n=69$ type 2) et chez des personnes en bonne santé ($n=43$) suivies pendant 5 ans, l'AF était fortement associée à la maladie coronarienne (OR= 7,9) et à la mortalité (OR=2,0) (212). Chez 973

autres patients atteints de diabète de type 2 comparés à 231 participants en bonne santé, l'AF était plus élevée à tous les âges (191). L'augmentation de la mortalité dans le diabète de type 1 et de type 2 survient lorsque l'AF excède 2,0 UA et augmente d'autant plus lorsque l'AF est supérieure à 3,0 UA. L'AF est plus fortement associée à la maladie coronarienne et à la mortalité que l'HbA1c, les triglycérides ou le cholestérol des lipoprotéines de faible densité. Cela souligne la forte valeur prédictive de l'AF chez les patients à risque. L'AF était élevée chez les sujets ayant une maladie coronarienne stable en comparaison à des sujets sains (213). L'AF augmente au cours d'un infarctus du myocarde (probablement dû à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation) et diminue après la phase aiguë (>200 jours) (214). Enfin, une AF au-dessus de la médiane était prédictrice d'évènements cardiovasculaires (hazard ratio [HR] =11.6), un aspect important pour la stratification des risques (214).

Autofluorescence cutané des AGE et diagnostic du diabète

Le diabète est défini par l'OMS comme un état d'hyperglycémie chronique (157). Puisque le développement du diabète de type 2 est précédé par des années de troubles métaboliques infracliniques menant potentiellement à l'accumulation des AGE, il est concevable que l'AF cutanée puisse être utilisée pour le dépistage du diabète. Par ailleurs, l'AF a été évaluée pour le diagnostic du diabète. Les biomarqueurs actuels pour le diagnostic du diabète sont la glycémie à jeun, l'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale et l'HbA1c. Cependant ces biomarqueurs représentent certains inconvénients : prix élevé, consommation de temps et sensibilité limitée (215). Dans une étude incluant 218 personnes ayant un risque moyen de diabète, les performances diagnostiques de la mesure d'AF combinée à un algorithme de diagnostic du diabète étaient supérieures à la glycémie à jeun et pas inférieures à l'HbA1c (sensibilité 82% ; spécificité 89%) (216). Dans deux autres études, l'AF montrait une sensibilité plus élevée que la glycémie à jeun ou l'HbA1c pour le diagnostic du diabète (217,218).

Certaines limites de nos travaux sont à prendre en compte. Tout d'abord, nous n'avons pas étudié la valeur pronostique de l'AF chez les personnes âgées, mais cela fait partie des perspectives de recherche. Ensuite, la taille assez limitée de nos échantillons pourrait représenter un problème de puissance statistique. Néanmoins, malgré une taille limitée, nous avons réussi à mettre en évidence des associations. De plus, nous n'avons pas recherché de seuil d'AF associé à la survenue d'évènements, ce qui pourrait être utile en pratique clinique ; cela sera à étudier dans le futur. Enfin, l'AGE-READER présente une limite qui est

l'impossibilité de mesurer l'AF sur les peaux foncées. Dans nos futures recherches nous essayerons de contourner cette limite en mesurant l'AF sur la paume de la main. Les données sont actuellement recueillies chez des femmes enceintes au niveau interne de l'avant bras et sur la paume de la main. Il faudra d'une part comparer la mesure faite sur la paume de la main à la mesure de l'AF faite habituellement au niveau interne de l'avant-bras et d'autre part étudier la valeur et la signification de cette mesure réalisée sur la paume de la main.

4.2 Prévention et inhibiteurs de l'accumulation des AGE

Les stratégies pour réduire les effets néfastes des AGE et accroître la longévité impliquent la prévention de la formation et de l'ingestion des AGE et l'élimination de ceux déjà formés.

Pour prévenir l'accumulation des AGE dans l'organisme il est essentiel d'adopter un mode de vie qui réduit l'exposition aux AGE. La prévention primaire pourrait passer par l'alimentation et la prévention du tabagisme.

Il existe différents moyens thérapeutiques d'interférer avec les effets physiopathologiques des AGE :

Pour prévenir la formation des AGE, des stratégies peuvent être les suivantes :

- Dans les phases précoces de la glycation, les bases de Schiff font l'objet d'oxydation conduisant à la génération de radicaux libres réactifs, de composés carbonylés, de protéines glyquées et de stress oxydant. Dans cette phase précoce, les approches thérapeutiques pourraient être le piégeage des radicaux libres pour diminuer le stress oxydant ou diminuer la formation des réactifs carbonylés.
- La deuxième approche serait de bloquer les composés carbonylés, les bases de Schiff et les produits d'Amadori pour inhiber la progression de la réaction de glycation

Pour détruire les AGE déjà formés et inhiber leurs effets, les stratégies peuvent être les suivantes :

- Casser les croisements covalents entre les protéines, ce qui permettrait de réduire l'accumulation des AGE et les lésions associées.
- Bloquer l'interaction des AGE avec leur récepteur RAGE ce qui permettrait de diminuer la génération de stress oxydant et l'inflammation dans les tissus (17).

Ces dernières années, plusieurs inhibiteurs des AGE ont été développés ; il existe des composés synthétiques et des inhibiteurs naturels extraits de plantes, dont voici quelques exemples :

Composés synthétiques :

- L'aminoguanidine qui inhibe la formation des AGE en séquestrant les composés carbonylés précurseurs des AGE (12,219).
- La metformine (ou Dimethylbisguanidine) qui est classiquement utilisée comme traitement du diabète de type 2. Plusieurs études suggèrent que la metformine réduit la concentration de composés carbonylés (220).

- Le 2 isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) qui inhibe la formation des AGE comme le CML ou la pentosidine par la chélation des ions métalliques (221).
- Le N-Phenylacetyl-1,3-thiazolium bromide (PTB) casse les liens covalents entre les protéines formées par les AGE et est impliqué dans l'atténuation du stress oxydant par la chélation des ions métalliques (222).
- Le N-Phenylacetyl-4,5-dimethyl-1,3 thiazolium chloride (ALT 711) inhibe les liens covalents formés par les AGE entre les protéines, casse les liens carbone-carbone des composés carbonylés (223) et réduit l'expression des récepteurs RAGE des AGE (224).
- Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine de type 1 (ARB) et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEI) qui diminuent la formation des AGE (225). Chez l'animal, ils réduisent l'accumulation du CML et de la pentosidine dans les reins (226) et diminuent la concentration de composés carbonylés (225).

Inhibiteurs des AGE dérivés des plantes :

- Le curcumine (Diferuloylmethane) pourrait prévenir l'accumulation des AGE sur le collagène et les liaisons covalentes ; des travaux ont été menés chez le rat diabétique (227,228).
- Les flavonoïdes contenus dans le vin rouge, le thé, les fruits et les légumes auraient un effet antiglycation partiellement grâce à leurs propriétés anti-oxydantes. Certains flavonoïdes pourraient inhiber les stades précoces, intermédiaires ou avancés de la réaction de glycation mais aussi la formation de liaisons covalentes (228).
- Les terpènes auraient la capacité d'inhiber la formation de CML et de pentosidine in vitro (229). Chez le rat diabétique, les terpènes inhiberaient l'accumulation du CML dans les reins et les récepteurs RAGE (230).
- La vitamine E en supplémentation diminuerait la concentration de collagène glyqué chez des patients diabétiques et inhiberait la formation des AGE dans des modèles animaux (231,232).

4.3 Perspectives de recherche

L'accumulation des AGE est un processus lent et inévitable. C'est pourquoi dans notre équipe nous projetons de continuer à décrire et à étudier l'intérêt de l'AF à différents âges clés : chez les personnes âgées, chez les femmes enceintes atteintes de diabète gestationnel et chez les étudiants.

Personnes âgées

Chez les personnes âgées, nous avons pour projet d'étudier la relation entre l'AF et la démence. Des analyses préliminaires ont été réalisées. Les résultats montrent qu'en analyse univariée chez 390 participants de 3C, l'AF est significativement associée à la démence incidente 2 ans plus tard, avec une AF plus élevée chez ceux qui ont développé une démence (3,15 UA vs 2,78 UA, $p=0,03$). Cependant, en analyse multivariée ajustée sur l'âge, le sexe, l'allèle apoε4, le niveau d'études, le tabac, le débit de filtration glomérulaire et le diabète, il n'y avait pas d'association significative ($\beta=1,09$, IC95 = 0,94 ; 1,27, $p=0,26$). Nous avons fait l'hypothèse que l'absence de significativité pourrait être due au fait que l'accumulation des AGE 2 ans avant l'évènement n'est pas assez discriminante car il s'agit d'un phénomène lent. De ce fait, nous attendons de refaire les analyses avec les données du suivi à 14 de la cohorte 3C.

Concernant l'étude des déterminants de l'AF, nous avons analysé la relation entre le régime méditerranéen et l'AF. Un article est actuellement en cours de rédaction. Le régime méditerranéen est typique de la Grèce et du sud de l'Italie, caractérisé par une consommation abondante de légumes et une consommation modérée de poisson, d'alcool et une faible consommation de viandes et de produits laitiers avec pour principale source d'acides gras mono-insaturé, l'huile d'olive. Le régime méditerranéen a déjà été proposé comme étant une option diététique pour la santé depuis qu'une meilleure adhérence au régime méditerranéen évaluée par le score MeDi a été associée à une plus longue espérance de vie, un risque réduit de maladies cardiovasculaires, et plusieurs maladies liées à l'âge. Les résultats de notre étude montrent une association entre l'AF et le régime méditerranéen. Une augmentation d'1 point du score MeDi est associée à une diminution de l'AF de -0.06 UA ($p= 0,02$). Ces résultats suggèrent que l'alimentation et d'autres facteurs nutritionnels pourraient influencer le niveau d'AF (poster présenté au congrès de l'European Association for the Study of Diabetes, Munich, 2016) (233).

De manière plus originale, il est envisagé de caractériser des profils de consommation alimentaire « typiques » d'une alimentation riche en AGE, ce qui n'a jamais été réalisé à notre

connaissance. En effet, avec le rappel des 24 heures nous disposons de données de consommation en aliments transformés ("bifteck grillé", "pain grillé", "dinde rotie", "pomme de terre frite"). Sur le modèle du score d'adhérence au régime méditerranéen, après avoir effectué une revue exhaustive de la littérature pour identifier et recenser les principales sources alimentaires en AGE, nous pourrions créer un score d'adhésion à une alimentation du type « riche en AGE ». Ce score permettrait d'identifier les sujets ayant une consommation élevée en aliments riches en AGE (aliments cuits à haute température).

Enfin, concernant la valeur pronostique et les déterminants de l'AF chez les personnes âgées de la cohorte 3C, nos objectifs pour les prochains mois sont de compléter l'étude des déterminants et de la valeur pronostique de l'AF, en évaluant :

- des déterminants génétiques, nutritionnels, antioxydants, perturbateurs endocriniens
- la valeur pronostique pour les maladies liées à l'âge (démence, Alzheimer, cardiovasculaires, reins, mortalité)

Femmes enceintes atteintes de diabète

Au cours de ma thèse, j'ai également recueilli des données dans un échantillon de femmes atteintes de diabète au cours de la grossesse pour étudier la relation entre l'AF et les complications maternelles et fœtales à l'accouchement. Notre population d'étude sera donc des femmes enceintes suivies au CHU de Bordeaux pour un diabète pendant la grossesse, et consentant à participer à l'étude. Le critère d'inclusion dans l'étude était la présence d'un trouble de la glycorégulation au cours de la grossesse. Les critères d'exclusion de l'étude étaient une peau noire ou foncée (mesure de l'AF non réalisable à cause de la pigmentation de la peau) et un refus à participer. A ce jour, le recrutement des femmes est réalisé avec 300 femmes incluses.

Le diabète gestationnel (DG) représente un problème de Santé publique croissant dans le contexte de l'épidémie de diabète et d'obésité. Le diabète gestationnel concernait 2 à 6 % des grossesses en France en 2010 (234) et la prévalence atteindrait 10% dans certains pays européens (235). Le DG est associé à une morbidité périnatale accrue chez l'enfant et la mère. La macrosomie est une complication fréquente chez l'enfant. Lorsque l'hyperglycémie est précoce au cours de la grossesse (236), les risques de surmortalité néonatale (237) et de malformations (238) sont majorés comme au cours des diabètes de type 2 ignorés au début de la grossesse. A l'âge adulte, le risque d'obésité et de diabète sont des conséquences importantes du DG chez l'enfant. Le DG expose aussi la mère à un risque plus élevé de pré-éclampsies et de césariennes (239). Disposer d'informations sur le statut glycémique des

femmes en début de grossesse grâce à l'évaluation de l'accumulation des AGE serait donc très utile.

Coffeng et al. ont montré que l'AF cutanée est plus élevée chez 17 femmes qui ont présenté une pré-éclampsie vs 16 contrôles (240). Dans notre étude, nous avons recueilli l'AF mais aussi les chiffres tensionnels, dosé l'excrétion urinaire d'albumine et l'uricémie chez des femmes enceintes ; les informations concernant l'HTA, la pré-éclampsie et la prématurité ont été recueillies par téléphone après l'accouchement.

Notre étude pilote suggère que l'AF peut être un marqueur de mémoire métabolique chez les femmes enceintes porteuses de diabète. L'AF est plus élevée si le diabète est connu antérieurement à la grossesse ; dans le cas des diabètes gestationnels, l'AF était plus élevée chez les femmes qui avaient un antécédent d'hyperglycémie (macrosomie ou diabète gestationnel au cours des grossesses antérieures) (241).

Dans ce projet, notre hypothèse principale est que l'AF cutanée des AGE reflète la mémoire métabolique des femmes ayant un diabète gestationnel et pourrait être associée au mauvais pronostic à l'accouchement et après la grossesse pour la mère et l'enfant.

Dans les prochains mois l'objectif général dans cette population est d'évaluer la valeur pronostique de l'AF cutanée pour les complications obstétricales et néonatales ainsi que pour la persistance du diabète chez la mère après l'accouchement. Les objectifs spécifiques sont :

- 1- Evaluer la valeur pronostique de l'AF pour la survenue d'évènements néonataux liés au DG, en particulier la macrosomie qui est la complication la plus fréquente du DG et expose à un risque plus élevé de dystocie des épaules et d'obésité à l'âge adulte. Nous nous intéresserons aussi aux complications plus sévères comme les malformations, la mortalité de l'enfant et l'ictère.
- 2- Evaluer la valeur pronostique de l'AF pour la survenue chez la mère de l'hypertension artérielle gravidique ou de la pré-éclampsie.
- 3- Evaluer la valeur pronostique de l'AF pour la persistance d'un trouble de la glycorégulation lors du dépistage par HGPO recommandé systématiquement 2 mois après accouchement.

L'étude de ces relations prendra en compte les caractéristiques cliniques et biologiques de la mère.

Autres perspectives

Par ailleurs, mon environnement de recherche me donne la possibilité dans mes perspectives postdoctorales d'étudier la relation entre nutrition et accumulation d'AGE dans une grande

cohorte d'étudiants (i-Share). Dans cette cohorte, la mesure d'AF est actuellement en cours de recueil.

D'autre part, outre l'étude de la mesure d'AF, reflétant le dépôt tissulaire d'AGE, qui nous a permis d'étudier les AGE par une approche épidémiologique en population générale et chez des sujets diabétiques dans le cadre de ma thèse, nous projetons d'étudier plus précisément la mise en jeu de la voie des AGE au niveau cellulaire. En effet, chez des sujets diabétiques qui vont développer des complications, une technique novatrice permet l'étude de biomarqueurs potentiels tel que le récepteur RAGE des AGE portés par les microvésicules de patients diabétiques. Pour cela nous allons analyser les microvésicules urinaires issues des cellules de sujets suivis par le Centre d'investigation clinique de Poitiers dans la cohorte "SURDIAGENE". Il s'agit d'un projet multidisciplinaire, associant des équipes d'épidémiologistes, de cliniciens et de biologistes de Poitiers et Bordeaux, regroupées dans la nouvelle Région Aquitaine. L'objectif est de capturer spécifiquement les microvésicules dans les urines prélevées lors de l'inclusion des sujets dans la cohorte, puis d'analyser les biomarqueurs portés par ces microvésicules en fonction du développement de complications chez ces sujets, avec un intérêt particulier pour l'axe AGE-RAGE et sa voie de signalisation.

4.4 Interdisciplinarité et perspectives de santé publique

Les travaux collaboratifs dans notre équipe « Lifelong health and aging » entre la recherche épidémiologique et l'enquête sur le terrain dans le service-nutrition diabétologie de l'Hôpital Haut Lévêque de Bordeaux, confortent l'association de l'AF cutanée avec les complications dans les deux principaux types de diabète (158,180,193,242). Ces travaux suggèrent aussi que l'autofluorescence peut être un marqueur de mémoire métabolique chez des sujets plus jeunes comme les femmes enceintes porteuses de diabète gestationnel (243). Ces résultats ont permis une passerelle rapide vers le domaine épidémiologique, en mettant en place cette mesure d'AF dans des études épidémiologiques. Ainsi, la cohorte des 3-Cités, disposant d'un suivi de 14 ans, est pionnière pour l'étude de l'AF cutanée en population âgée générale. Dans cette population, nos premiers résultats confortent sa valeur comme marqueur de mémoire métabolique et de l'équilibre alimentaire (244). Cette étude épidémiologique permettra aussi un retour efficace pour le bénéfice du patient en pratique clinique.

D'un point de vue de Santé publique, la mesure d'AF pourrait être utile car elle est simple, non invasive et rapide donc applicable à une grande population ; son application permettrait de mieux comprendre l'impact de l'exposition aux AGE dans la population. Elle pourrait améliorer la prédiction, la prévention et la compréhension précoce des maladies liées à l'âge puisqu'elle paraît refléter une exposition sur au moins 10 ans et semble être utile dans l'évaluation du risque à long terme.

4.5 Conclusion

A ce stade, nous avons montré que l'évaluation de l'accumulation tissulaire des AGE par la mesure d'AF pourrait renseigner sur les antécédents métabolique et rénal, ainsi que sur l'alimentation passée. De plus, elle pourrait aider dans la prédiction de la survenue des maladies liées à l'âge et des complications du diabète.

Ce marqueur pourrait être d'un grand intérêt dans la pratique clinique et dans la recherche épidémiologique. En clinique, le fait que l'AF soit associée à l'équilibre glycémique 10 ans auparavant pourrait répondre à un besoin, car elle apporte une information sur l'équilibre métabolique à plus long terme par rapport aux marqueurs classiques qui sont actuellement utilisés comme l'HbA1c qui reflète l'équilibre glycémique sur seulement 3 mois. De plus, le caractère rapide et non-invasif de cette mesure contribuerait à son acceptabilité par les cliniciens et les patients. En recherche épidémiologique, ces caractéristiques faciliteraient l'extension de la mesure d'AF à un grand nombre d'individus.

Dans le futur, les recherches sur la valeur de la mesure d'AF cutanée des AGE en tant que biomarqueur précoce des maladies liées à l'âge restent encore à compléter. C'est pourquoi, nous comptons continuer à décrire et étudier l'intérêt de l'AF à différents âges clés de la vie, des populations les plus jeunes aux plus âgées : chez les personnes âgées, chez les femmes enceintes atteintes de diabète gestationnel et chez les étudiants. Parmi les pistes de recherche, plusieurs questions restent encore en suspens. Il faudrait notamment mieux explorer les déterminants de la mesure d'AF, décrire et avoir des références de la mesure d'AF dans différents types de populations, établir des seuils spécifiques aux maladies étudiées et décrire l'évolution à long terme de la mesure d'AF.

Références

1. Definition, Diagnostic and Classification of Diabetes Mellitus and its complications [Internet]. World Health Organization. Department of Noncommunicable Disease surveillance. Geneva; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf
2. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047–53.
4. Anton SD, Woods AJ, Ashizawa T, Barb D, Buford TW, Carter CS, et al. Successful aging: Advancing the science of physical independence in older adults. *Ageing Res Rev*. 2015 Nov;24:304–27.
5. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001 Feb;44(2):129–46.
6. Krautwald M, Münch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Exp Gerontol*. 2010 Oct;45(10):744–51.
7. Hirose J, Yamabe S, Takada K, Okamoto N, Nagai R, Mizuta H. Immunohistochemical distribution of advanced glycation end products (AGEs) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Histochem*. 2011 Oct;113(6):613–8.
8. Basta G. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2004 Sep;63(4):582–92.
9. Hyogo H, Yamagishi S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10):969–72.
10. Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2014 Sep;42:85–102.
11. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Sep 22];47(7). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-004-1451-2>
12. Busch M, Franke S, Ruster C, Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney: AGEs AND KIDNEY. *Eur J Clin Invest*. 2010 Jul 9;40(8):742–55.
13. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Sep 1;65A(9):963–75.
14. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813–20.

15. Van Nguyen C. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res*. 2006 Dec;50(12):1140–9.
16. Maillard Reaction [Internet]. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2002 [cited 2016 Jun 22]. Available from: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781847552105>
17. Jahan H, Choudhary MI. Glycation, carbonyl stress and AGEs inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(11):1267–84.
18. Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Mol Metab*. 2014 Apr;3(2):94–108.
19. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):1–9.
20. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1999 Apr;10(4):822–32.
21. Gillery P. [Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006 Aug;64(4):309–14.
22. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(5):339–52.
23. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1994 Feb;70(2):138–51.
24. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Oct;289(4):F645-659.
25. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1–21.
26. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*. 1995;46:223–34.
27. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787–90.
28. Ilnat MA, Thorpe JE, Ceriello A. Hypothesis: the 'metabolic memory?', the new challenge of diabetes. *Diabet Med*. 2007 Jun;24(6):582–6.
29. Traverso N, Menini S, Cottalasso D, Odetti P, Marinari UM, Pronzato MA. Mutual interaction between glycation and oxidation during non-enzymatic protein modification. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 20;1336(3):409–18.
30. Nedić O, Rattan SIS, Grune T, Trougakos IP. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res*. 2013 Aug;47(sup1):28–38.

31. Bucala R. Lipoprotein Modification by Advanced Glycosylation Endproducts (AGEs): Role in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 1997 Feb;7(2):39–47.
32. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813–20.
33. Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging.* 2007;2(3):401–12.
34. Rattan SIS. Increased molecular damage and heterogeneity as the basis of aging. *Biol Chem.* 2008 Mar;389(3):267–72.
35. Rattan SIS. Synthesis, modification and turnover of proteins during aging. *Adv Exp Med Biol.* 2010;694:1–13.
36. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther.* 2010 May;12(5):399–403.
37. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, Scheubel RJ, Börgermann J, Silber RE, et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Für Gerontol Geriatr.* 2007 Oct;40(5):349–56.
38. Li S-Y, Du M, Dolence EK, Fang CX, Mayer GE, Ceylan-Isik AF, et al. Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification. *Aging Cell.* 2005 Apr;4(2):57–64.
39. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Nov 21;663:421–2.
40. Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J.* 2000 Sep 1;350 Pt 2:381–7.
41. Sato Y, Kondo T, Ohshima T. Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus. *Histopathology.* 2001 Mar;38(3):217–20.
42. Sell DR, Kleinman NR, Monnier VM. Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycooxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2000 Jan;14(1):145–56.
43. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al. Advanced glycooxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004 Aug;104(8):1287–91.
44. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc.* 2010 Jun;110(6):911–916.e12.
45. Assar SH, Moloney C, Lima M, Magee R, Ames JM. Determination of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids.* 2009 Feb;36(2):317–26.

46. Ahmed N, Mirshekar-Syahkal B, Kennish L, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Jul;49(7):691–9.
47. Sebeková K, Saavedra G, Zumpe C, Somoza V, Klenovicsová K, Birlouez-Aragon I. Plasma concentration and urinary excretion of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and formula-fed infants. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Apr;1126:177–80.
48. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6474–9.
49. Tessier FJ, Birlouez-Aragon I. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids*. 2012 Apr;42(4):1119–31.
50. Negrean M, Stirban A, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting C, et al. Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2007 May;85(5):1236–43.
51. Forbes JM, Sourris KC, de Courten MPJ, Dougherty SL, Chand V, Lyons JG, et al. Advanced glycation end products (AGEs) are cross-sectionally associated with insulin secretion in healthy subjects. *Amino Acids*. 2014 Feb;46(2):321–6.
52. Tahara N, Yamagishi S-I, Matsui T, Takeuchi M, Nitta Y, Kodama N, et al. Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects. *Cardiovasc Ther*. 2012 Feb;30(1):42–8.
53. Mark AB, Poulsen MW, Andersen S, Andersen JM, Bak MJ, Ritz C, et al. Consumption of a diet low in advanced glycation end products for 4 weeks improves insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care*. 2014;37(1):88–95.
54. Nicholl ID, Bucala R. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr*. 1998 Nov;44(7):1025–33.
55. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, et al. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13915–20.
56. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2012 Jan 1;35(Supplement_1):S64–71.
57. Mericq V, Piccardo C, Cai W, Chen X, Zhu L, Striker GE, et al. Maternally Transmitted and Food-Derived Glycotoxins: A factor preconditioning the young to diabetes? *Diabetes Care*. 2010 Oct 1;33(10):2232–7.
58. Li R, Yang P, Chen X, Wang L. Maternal serum AGEs levels in pregnancies associated with neural tube defects. *Int J Dev Neurosci*. 2014 Apr;33:57–61.
59. Rzepka R, Dołęgowska B, Sałata D, Rajewska A, Budkowska M, Domański L, et al. Soluble receptors for advanced glycation end products and receptor activator of NF-κB ligand serum levels as markers of premature labor. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2015 Dec [cited 2015 Nov 25];15(1). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/15/134>

60. Rogers LK, Graf AE, Bhatia A, Leonhart KL, Oza-Frank R. Associations between Maternal and Infant Morbidities and sRAGE within the First Week of Life in Extremely Preterm Infants. Hudson BI, editor. PLoS ONE. 2013 Dec 6;8(12):e82537.
61. Guedes-Martins L, Matos L, Soares A, Silva E, Almeida H. AGEs, contributors to placental bed vascular changes leading to preeclampsia. *Free Radic Res.* 2013 Aug;47(S1):70–80.
62. Saito A, Takeda T, Sato K, Hama H, Tanuma A, Kaseda R, et al. Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:637–43.
63. Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, Sun K, Beck J, Dalal M, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2009 Jan;53(1):51–8.
64. Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2000 Mar;35(3):365–80.
65. Busch M, Franke S, Müller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, et al. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney Int.* 2004 Jul;66(1):338–47.
66. Agalou S. Profound Mishandling of Protein Glycation Degradation Products in Uremia and Dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Mar 30;16(5):1471–85.
67. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):2995–3004.
68. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997 Feb 1;99(3):457–68.
69. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med Maywood NJ.* 2008 Jan;233(1):4–11.
70. Luna P, Guarner V, Farías JM, Hernández-Pacheco G, Martínez M. Importance of Metabolic Memory in the Development of Vascular Complications in Diabetic Patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2016 Oct;30(5):1369–78.
71. Ceriello A. The emerging challenge in diabetes: The “metabolic memory.” *Vascul Pharmacol.* 2012 Nov;57(5–6):133–8.
72. Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes.* 1987 Jul;36(7):808–12.
73. Hammes HP, Klinzing I, Wiegand S, Bretzel RG, Cohen AM, Federlin K. Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993 May;34(6):2092–6.

74. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):977–86.
75. Intensive Diabetes Therapy and Glomerular Filtration Rate in Type 1 Diabetes. *N Engl J Med.* 2011 Dec 22;365(25):2366–76.
76. White NH, Sun W, Cleary PA, Danis RP, Davis MD, Hainsworth DP, et al. Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960.* 2008 Dec;126(12):1707–15.
77. Nathan DM, Cleary PA, Backlund J-YC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005 Dec 22;353(25):2643–53.
78. Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R, DCCT/EDIC Research Group. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care.* 2014;37(1):31–8.
79. Pirola L, Balcerczyk A, Okabe J, El-Osta A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2010 Dec;6(12):665–75.
80. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2008 Oct 9;359(15):1577–89.
81. Ceriello A, Ihnat M, Ross K, Sismey A, Green DW, Kaltreider RC et al. Evidence for a cellular “memory” of hyperglycemic stress. *Diabetes* 2005; 54 : 218A.
82. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrative stress in diabetic rats. *Diabetes.* 2003 Mar;52(3):818–23.
83. Kowluru RA, Chakrabarti S, Chen S. Re-institution of good metabolic control in diabetic rats and activation of caspase-3 and nuclear transcriptional factor (NF-kappaB) in the retina. *Acta Diabetol.* 2004 Dec;41(4):194–9.
84. Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *J Diabetes Complications.* 2004 Oct;18(5):282–8.
85. Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007 Mar;30(3):649–54.
86. Ceriello A, Esposito K, Ihnat M, Thorpe J, Giugliano D. Long-term glycemic control influences the long-lasting effect of hyperglycemia on endothelial function in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Aug;94(8):2751–6.
87. Ling C, Groop L. Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2009 Dec 1;58(12):2718–25.
88. Keating S, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes: Epigenetics in diabetes. *Clin Genet.* 2013 Jul;84(1):1–10.

89. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerczyk A, George P, Baker EK, et al. Hyperglycemia Induces a Dynamic Cooperativity of Histone Methylase and Demethylase Enzymes Associated With Gene-Activating Epigenetic Marks That Coexist on the Lysine Tail. *Diabetes*. 2009 May 1;58(5):1229–36.
90. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2409–17.
91. Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens*. 2001 May;14(5 Pt 1):475–86.
92. Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 2003 Sep 23;108(12):1527–32.
93. Hurst RT, Lee RW. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management. *Ann Intern Med*. 2003 Nov 18;139(10):824–34.
94. Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2011 Aug;11(4):253–64.
95. Najafian B, Alpers CE, Fogo AB. Pathology of human diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol*. 2011;170:36–47.
96. Gray SP, Jandeleit-Dahm K. The pathobiology of diabetic vascular complications—cardiovascular and kidney disease. *J Mol Med*. 2014 May;92(5):441–52.
97. Rahman S, Rahman T, Ismail AA-S, Rashid ARA. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab*. 2007 Nov;9(6):767–80.
98. Sudhakaran S, Surani SR. Guidelines for Perioperative Management of the Diabetic Patient. *Surg Res Pract*. 2015;2015:284063.
99. Duncan AE. Hyperglycemia and perioperative glucose management. *Curr Pharm Des*. 2012;18(38):6195–203.
100. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1991 Oct;40(10):1328–34.
101. Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, et al. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes*. 1997 May;46(5):895–9.
102. Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol*. 1988 Sep 20;203(2):495–505.
103. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem*. 1992 Jun 25;267(18):12404–7.

104. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A “glycooxidation-centric” point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 Oct;23(10):913–9.
105. Yamagishi S, Nakamura K, Imaizumi T. Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications. *Curr Diabetes Rev*. 2005 Feb;1(1):93–106.
106. Wada R, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:598–604.
107. Sekido H, Suzuki T, Jomori T, Takeuchi M, Yabe-Nishimura C, Yagihashi S. Reduced cell replication and induction of apoptosis by advanced glycation end products in rat Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 16;320(1):241–8.
108. Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, et al. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med*. 2012 Jun;18(6):926–33.
109. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1983 May;32 Suppl 2:64–78.
110. Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes*. 1995 Oct;44(10):1139–46.
111. Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J Biol Chem*. 2002 Jun 7;277(23):20309–15.
112. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2001 May;12(5):993–1000.
113. Silbiger S, Crowley S, Shan Z, Brownlee M, Satriano J, Schlondorff D. Nonenzymatic glycation of mesangial matrix and prolonged exposure of mesangial matrix to elevated glucose reduces collagen synthesis and proteoglycan charge. *Kidney Int*. 1993 Apr;43(4):853–64.
114. Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF, Hudson JK, Hudson BG. Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int*. 1997 Nov;52(5):1302–12.
115. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960*. 1984 Apr;102(4):527–32.
116. Mandarino LJ. Current hypotheses for the biochemical basis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1992 Dec;15(12):1892–901.
117. Frank RN. On the pathogenesis of diabetic retinopathy. A 1990 update. *Ophthalmology*. 1991 May;98(5):586–93.

118. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol.* 1997 Feb;150(2):523–31.
119. Sharma NK, Gardiner TA, Archer DB. A morphologic and autoradiographic study of cell death and regeneration in the retinal microvasculature of normal and diabetic rats. *Am J Ophthalmol.* 1985 Jul 15;100(1):51–60.
120. Yamagishi S, Hsu CC, Taniguchi M, Harada S, Yamamoto Y, Ohsawa K, et al. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: a possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Aug 15;213(2):681–7.
121. Bloomgarden ZT. Cardiovascular disease in diabetes. *Diabetes Care.* 2008 Jun;31(6):1260–6.
122. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia.* 2003 Jun;46(6):760–5.
123. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 1991 Feb;87(2):432–8.
124. Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity T, Vlassara H, Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1995 May 5;270(18):10828–32.
125. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1395–403.
126. Kimura T, Takamatsu J, Ikeda K, Kondo A, Miyakawa T, Horiuchi S. Accumulation of advanced glycation end products of the Maillard reaction with age in human hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 1996 Apr 12;208(1):53–6.
127. Castellani RJ, Harris PL, Sayre LM, Fujii J, Taniguchi N, Vitek MP, et al. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jul 15;31(2):175–80.
128. Srikanth V, Westcott B, Forbes J, Phan TG, Beare R, Venn A, et al. Methylglyoxal, cognitive function and cerebral atrophy in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013 Jan;68(1):68–73.
129. Yaffe K, Lindquist K, Schwartz AV, Vitartas C, Vittinghoff E, Satterfield S, et al. Advanced glycation end product level, diabetes, and accelerated cognitive aging. *Neurology.* 2011 Oct 4;77(14):1351–6.
130. Southern L, Williams J, Esiri MM. Immunohistochemical study of N-epsilon-carboxymethyl lysine (CML) in human brain: relation to vascular dementia. *BMC Neurol.* 2007;7:35.

131. Franke S, Dawczynski J, Strobel J, Niwa T, Stahl P, Stein G. Increased levels of advanced glycation end products in human cataractous lenses. *J Cataract Refract Surg.* 2003 May;29(5):998–1004.
132. Gul A, Rahman MA, Salim A, Simjee SU. Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract. *J Diabetes Complications.* 2009 Oct;23(5):343–8.
133. Nerlich AG, Schleicher ED. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis.* 1999 May;144(1):41–7.
134. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994 Apr 1;269(13):9889–97.
135. Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis.* 2008 Jan;196(1):9–21.
136. Semba RD, Bandinelli S, Sun K, Guralnik JM, Ferrucci L. Plasma carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, and all-cause and cardiovascular disease mortality in older community-dwelling adults. *J Am Geriatr Soc.* 2009 Oct;57(10):1874–80.
137. Stam F, Schalkwijk CG, van Guldener C, ter Wee PM, Stehouwer CDA. Advanced glycation end-product peptides are associated with impaired renal function, but not with biochemical markers of endothelial dysfunction and inflammation, in non-diabetic individuals. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2006 Mar;21(3):677–82.
138. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Patel KV, Guralnik JM, Fried LP. Elevated serum advanced glycation end products and their circulating receptors are associated with anaemia in older community-dwelling women. *Age Ageing.* 2009 May;38(3):283–9.
139. Semba RD, Fink JC, Sun K, Bandinelli S, Guralnik JM, Ferrucci L. Carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, and decline of renal function in older community-dwelling adults. *Eur J Nutr.* 2009 Feb;48(1):38–44.
140. Hein GE. Glycation endproducts in osteoporosis--is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2006 Sep;371(1–2):32–6.
141. Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirnigliaro M, Federici M, et al. Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:710–7.
142. Tang SY, Zeenath U, Vashishth D. Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. *Bone.* 2007 Apr;40(4):1144–51.
143. Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatol Oxf Engl.* 2003 Oct;42(10):1242–6.
144. Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, Feingold KR, et al. Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jul;94(7):2380–6.

145. Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Dec;103(6):2068–76.
146. Snow LM, Fugere NA, Thompson LV. Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007 Nov;62(11):1204–10.
147. Couppé C, Hansen P, Kongsgaard M, Kovanen V, Suetta C, Aagaard P, et al. Mechanical properties and collagen cross-linking of the patellar tendon in old and young men. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2009 Sep;107(3):880–6.
148. Semba RD, Bandinelli S, Sun K, Guralnik JM, Ferrucci L. Relationship of an advanced glycation end product, plasma carboxymethyl-lysine, with slow walking speed in older adults: the InCHIANTI study. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Jan;108(1):191–5.
149. Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting C, et al. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006 Sep;29(9):2064–71.
150. Lyons TJ, Bailie KE, Dyer DG, Dunn JA, Baynes JW. Decrease in skin collagen glycation with improved glycemic control in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1991 Jun;87(6):1910–5.
151. Smit AJ, Gerrits EG. Skin autofluorescence as a measure of advanced glycation endproduct deposition: a novel risk marker in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 Nov;19(6):527–33.
152. Meerwaldt R. Skin Autofluorescence, a Measure of Cumulative Metabolic Stress and Advanced Glycation End Products, Predicts Mortality in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Dec 1;16(12):3687–93.
153. Cleary PA, Braffett BH, Orchard T, Lyons TJ, Maynard J, Cowie C, et al. Clinical and Technical Factors Associated with Skin Intrinsic Fluorescence in Subjects with Type 1 Diabetes from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. *Diabetes Technol Ther*. 2013 Jun;15(6):466–74.
154. de Ranitz-Greven WL, Kaasenbrood L, Poucki WK, Hamerling J, Bos DC, Visser GHA, et al. Advanced Glycation End Products, Measured as Skin Autofluorescence, During Normal Pregnancy and Pregnancy Complicated by Diabetes Mellitus. *Diabetes Technol Ther*. 2012 Dec;14(12):1134–9.
155. Gerrits EG, Smit AJ, Bilo HJG. AGEs, autofluorescence and renal function. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Oct 8;24(3):710–3.
156. 3C Study Group. Vascular factors and risk of dementia: design of the Three-City Study and baseline characteristics of the study population. *Neuroepidemiology*. 2003 Dec;22(6):316–25.
157. Alberti KGMM, Zimmet PZ, WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):539–53.

158. Genevieve M, Vivot A, Gonzalez C, Raffaitin C, Barberger-Gateau P, Gin H, et al. Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2013 Sep;39(4):349–54.
159. Gin H, Baudoin R, Raffaitin CH, Rigalleau V, Gonzalez C. Non-invasive and quantitative assessment of sudomotor function for peripheral diabetic neuropathy evaluation. *Diabetes Metab.* 2011 Dec;37(6):527–32.
160. Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, et al. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain.* 2005 Mar;114(1–2):29–36.
161. Gin H, Rigalleau V, Perlemoine C. Insulin therapy and body weight, body composition and muscular strength in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Metab.* 2010;2010.
162. Vinik AI, Nevoret M-L, Casellini C. The New Age of Sudomotor Function Testing: A Sensitive and Specific Biomarker for Diagnosis, Estimation of Severity, Monitoring Progression, and Regression in Response to Intervention. *Front Endocrinol [Internet].* 2015 Jun 11 [cited 2015 Sep 23];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2015.00094/abstract>
163. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology.* 1993 Apr;43(4):817–24.
164. Said G. Diabetic neuropathy—a review. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007 Jun;3(6):331–40.
165. Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions. *Pharmacol Res.* 2014 Feb;80:21–35.
166. Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res.* 2012 May;159(5):355–65.
167. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3103–11.
168. Orchard TJ, Lyons TJ, Cleary PA, Braffett BH, Maynard J, Cowie C, et al. The Association of Skin Intrinsic Fluorescence With Type 1 Diabetes Complications in the DCCT/EDIC Study. *Diabetes Care.* 2013 Oct 1;36(10):3146–53.
169. Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products: Marker of Metabolic Memory in Elderly Population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015 Jul 1;70(7):841–6.
170. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, Graaff R, Groenier KH, Smit AJ, et al. Skin Autofluorescence: A tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care.* 2008 Mar 1;31(3):517–21.

171. Lutgers HL, Gerrits EG, Graaff R, Links TP, Sluiter WJ, Gans RO, et al. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009 May;52(5):789–97.
172. Sugisawa E, Miura J, Iwamoto Y, Uchigata Y. Skin Autofluorescence Reflects Integration of Past Long-Term Glycemic Control in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Aug 1;36(8):2339–45.
173. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005 Dec;16(12):3687–93.
174. Nelson RG, Tuttle KR. The New KDOQITM Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and CKD. *Blood Purif*. 2006 Dec 14;25(1):112–4.
175. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, Groenier KH, Smit AJ, Gans RO, et al. Skin advanced glycation end product accumulation is poorly reflected by glycemic control in type 2 diabetic patients (ZODIAC-9) 1, Lutgers HL, Kleefstra N, Groenier KH, Smit AJ, Gans RO, Bilo HJ. *J Diabetes Sci Technol*. 2008 Jul;572–7.
176. Aroda VR, Conway BN, Fernandez SJ, Matter NI, Maynard JD, Orchard TJ, et al. Cross-Sectional Evaluation of Noninvasively Detected Skin Intrinsic Fluorescence and Mean Hemoglobin A1c in Type 1 Diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2013 Feb;15(2):117–23.
177. Chabroux S, Canouï-Poitrine F, Reffet S, Mills-Joncour G, Morelon E, Colin C, et al. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. *Diabetes Metab*. 2010 Apr;36(2):152–7.
178. Oleniuc M, Schiller A, Secara I, Onofriescu M, Hogas S, Apetrii M, et al. Evaluation of advanced glycation end products accumulation, using skin autofluorescence, in CKD and dialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2012 Oct;44(5):1441–9.
179. Tanaka K, Nakayama M, Kanno M, Kimura H, Watanabe K, Tani Y, et al. Skin Autofluorescence Is Associated with the Progression of Chronic Kidney Disease: A Prospective Observational Study. James LR, editor. *PLoS ONE*. 2013 Dec 12;8(12):e83799.
180. Rigalleau V, Cougnard-Gregoire A, Nov S, Gonzalez C, Maury E, Lorrain S, et al. Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2015 Mar;29(2):270–4.
181. Mulder DJ, Water TVD, Lutgers HL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, et al. Skin Autofluorescence, a Novel Marker for Glycemic and Oxidative Stress-Derived Advanced Glycation Endproducts: An Overview of Current Clinical Studies, Evidence, and Limitations. *Diabetes Technol Ther*. 2006 Oct;8(5):523–35.
182. Crowley LE, Johnson CP, McIntyre N, Fluck RJ, McIntyre CW, Taal MW, et al. Tissue Advanced Glycation End Product Deposition after Kidney Transplantation. *Nephron Clin Pract*. 2013;124(1–2):54–9.

183. Rosenlund S, Hansen TW, Andersen S, Rossing P. Effect of 4 years subcutaneous insulin infusion treatment on albuminuria, kidney function and HbA_{1c} compared with multiple daily injections: a longitudinal follow-up study. *Diabet Med*. 2015 Nov;32(11):1445–52.
184. Steineck I, Cederholm J, Eliasson B, Rawshani A, Eeg-Olofsson K, Svensson A-M, et al. Insulin pump therapy, multiple daily injections, and cardiovascular mortality in 18 168 people with type 1 diabetes: observational study. *BMJ*. 2015 Jun 22;350(jun22 1):h3234–h3234.
185. Tumminia A, Crimi S, Sciacca L, Buscema M, Frittitta L, Squatrito S, et al. Efficacy of real-time continuous glucose monitoring on glycaemic control and glucose variability in type 1 diabetic patients treated with either insulin pumps or multiple insulin injection therapy: a randomized controlled crossover trial. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015 Jan;31(1):61–8.
186. Saisho Y. Glycemic variability and oxidative stress: a link between diabetes and cardiovascular disease? *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):18381–406.
187. Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PHN, Brouwer T, Jager J, Castro Cabezas M, et al. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study: Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications. *Diabet Med*. 2012 Dec;29(12):1556–61.
188. Beisswenger PJ, Howell SK, Russell GB, Miller ME, Rich SS, Mauer M. Early progression of diabetic nephropathy correlates with methylglyoxal-derived advanced glycation end products. *Diabetes Care*. 2013 Oct;36(10):3234–9.
189. Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products: Marker of Metabolic Memory in Elderly Population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015 Jul 1;70(7):841–6.
190. Felipe DL, Hempe JM, Liu S, Matter N, Maynard J, Linares C, et al. Skin Intrinsic Fluorescence Is Associated With Hemoglobin A1c and Hemoglobin Glycation Index but Not Mean Blood Glucose in Children With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Aug 1;34(8):1816–20.
191. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, et al. Skin Autofluorescence as a Noninvasive Marker of Vascular Damage in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2006 Dec 1;29(12):2654–9.
192. Tanaka K, Tani Y, Asai J, Nemoto F, Kusano Y, Suzuki H, et al. Skin autofluorescence is associated with severity of vascular complications in Japanese patients with Type 2 diabetes: Skin advanced glycation end products and diabetic vascular complications. *Diabet Med*. 2012 Apr;29(4):492–500.
193. Vélayoudom-Céphise F-L, Rajaobelina K, Helmer C, Nov S, Pupier E, Blanco L, et al. Skin autofluorescence predicts cardio-renal outcome in type 1 diabetes: a longitudinal study. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2016 Sep 20];15(1). Available from: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0448-8>

194. McIntyre NJ, Fluck RJ, McIntyre CW, Taal MW. Skin Autofluorescence and the Association with Renal and Cardiovascular Risk Factors in Chronic Kidney Disease Stage 3. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Oct 1;6(10):2356–63.
195. Ueno H, Koyama H, Tanaka S, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, et al. Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism*. 2008 Oct;57(10):1452–7.
196. McIntyre NJ, Chesterton LJ, John SG, Jefferies HJ, Burton JO, Taal MW, et al. Tissue-advanced glycation end product concentration in dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2010 Jan;5(1):51–5.
197. Sebeková K, Podracká L, Heidland A, Schinzel R. Enhanced plasma levels of advanced glycation end products (AGE) and pro-inflammatory cytokines in children/adolescents with chronic renal insufficiency and after renal replacement therapy by dialysis and transplantation--are they inter-related? *Clin Nephrol*. 2001 Dec;56(6):S21-26.
198. Hartog JW, Gross S, Oterdoom LH, van Ree RM, de Vries APJ, Smit AJ, et al. Skin-autofluorescence is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):1069–77.
199. Gerrits EG, Lutgers HL, Smeets GHW, Groenier KH, Smit AJ, Gans ROB, et al. Skin autofluorescence: a pronounced marker of mortality in hemodialysis patients. *Nephron Extra*. 2012 Jan;2(1):184–91.
200. Kimura H, Tanaka K, Kanno M, Watanabe K, Hayashi Y, Asahi K, et al. Skin autofluorescence predicts cardiovascular mortality in patients on chronic hemodialysis. *Ther Apher Dial Off Peer-Rev J Int Soc Apher Jpn Soc Apher Jpn Soc Dial Ther*. 2014 Oct;18(5):461–7.
201. Hartog JW, de Vries APJ, Bakker SJL, Graaff R, van Son WJ, van der Heide JJH, et al. Risk factors for chronic transplant dysfunction and cardiovascular disease are related to accumulation of advanced glycation end-products in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2006 Aug;21(8):2263–9.
202. Conway BN, Aroda VR, Maynard JD, Matter N, Fernandez S, Ratner RE, et al. Skin Intrinsic Fluorescence Correlates With Autonomic and Distal Symmetrical Polyneuropathy in Individuals With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Apr 1;34(4):1000–5.
203. Meerwaldt R, Links TP, Graaff R, Hoogenberg K, Lefrandt JD, Baynes JW, et al. Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2005 Aug;48(8):1637–44.
204. Sims TJ, Rasmussen LM, Oxlund H, Bailey AJ. The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. *Diabetologia*. 1996 Aug;39(8):946–51.
205. Watfa G, Soulis G, Tartagni E, Kearney-Schwartz A, Borghi C, Salvi P, et al. Relationship between tissue glycation measured by autofluorescence and pulse wave velocity in young and elderly non-diabetic populations. *Diabetes Metab*. 2012 Nov;38(5):413–9.

206. Januszewski AS, Sachithanandan N, Karschikus C, O'Neal DN, Yeung CK, Alkatib N, et al. Non-invasive measures of tissue autofluorescence are increased in Type 1 diabetes complications and correlate with a non-invasive measure of vascular dysfunction. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2012 Jun;29(6):726–33.
207. Hofmann B, Adam A-C, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, et al. Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? *Exp Gerontol.* 2013 Jan;48(1):38–44.
208. Lutgers HL, Graaff R, De Vries R, Smit AJ, Dullaart RPF. Carotid artery intima media thickness associates with skin autofluorescence in non-diabetic subjects without clinically manifest cardiovascular disease: IMT ASSOCIATES WITH SKIN AUTOFLUORESCENCE. *Eur J Clin Invest.* 2010 Jun 29;40(9):812–7.
209. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Loeffen EAH, Saleem BR, Meerwaldt R, Lutgers HL, et al. Skin autofluorescence is increased in patients with carotid artery stenosis and peripheral artery disease. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2012 Feb;28(2):431–8.
210. de Vos LC, Mulder DJ, Smit AJ, Dullaart RPF, Kleefstra N, Lijfering WM, et al. Skin autofluorescence is associated with 5-year mortality and cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Apr;34(4):933–8.
211. Conway B, Edmundowicz D, Matter N, Maynard J, Orchard T. Skin fluorescence correlates strongly with coronary artery calcification severity in type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2010 May;12(5):339–45.
212. Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP, Graaff R, Baynes JW, Gans ROB, et al. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care.* 2007 Jan;30(1):107–12.
213. Mulder DJ, van Haelst PL, Gross S, de Leeuw K, Bijzet J, Graaff R, et al. Skin autofluorescence is elevated in patients with stable coronary artery disease and is associated with serum levels of neopterin and the soluble receptor for advanced glycation end products. *Atherosclerosis.* 2008 Mar;197(1):217–23.
214. Mulder DJ, van Haelst PL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, Smit AJ. Skin autofluorescence is elevated in acute myocardial infarction and is associated with the one-year incidence of major adverse cardiac events. *Neth Heart J Mon J Neth Soc Cardiol Neth Heart Found.* 2009 Apr;17(4):162–8.
215. Noordzij MJ, Lefrandt JD, Graaff R, Smit AJ. Dermal factors influencing measurement of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther.* 2011 Feb;13(2):165–70.
216. Smit AJ, Smit JM, Botterblom GJ, Mulder DJ. Skin autofluorescence based decision tree in detection of impaired glucose tolerance and diabetes. *PloS One.* 2013;8(6):e65592.
217. Maynard JD, Rohrscheib M, Way JF, Nguyen CM, Ediger MN. Noninvasive type 2 diabetes screening: superior sensitivity to fasting plasma glucose and A1C. *Diabetes Care.* 2007 May;30(5):1120–4.
218. Tentolouris N, Lathouris P, Lontou S, Tzemos K, Maynard J. Screening for HbA1c-defined prediabetes and diabetes in an at-risk greek population: performance comparison

- of random capillary glucose, the ADA diabetes risk test and skin fluorescence spectroscopy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013 Apr;100(1):39–45.
219. Thornalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem Pharmacol.* 2000 Jul 1;60(1):55–65.
220. Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M, Wiernsperger N. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol.* 1999 Dec 1;58(11):1765–73.
221. Miyata T, van Ypersele de Strihou C. Angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Nov 1;419(1):50–4.
222. Reddy VP, Beyaz A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov Today.* 2006 Jul;11(13–14):646–54.
223. Kass DA. Getting better without AGE: new insights into the diabetic heart. *Circ Res.* 2003 Apr 18;92(7):704–6.
224. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res.* 2003 Apr 18;92(7):785–92.
225. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, Ichimori K, Inagi R, Onogi H, et al. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products: biochemical mechanisms. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2002 Oct;13(10):2478–87.
226. Nangaku M, Miyata T, Sada T, Mizuno M, Inagi R, Ueda Y, et al. Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2003 May;14(5):1212–22.
227. Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochem Pharmacol.* 1998 Dec 15;56(12):1607–14.
228. Wu C-H, Huang S-M, Lin J-A, Yen G-C. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct.* 2011 May;2(5):224–34.
229. Motomura K, Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Takeya M, Nohara T, et al. Astragalosides isolated from the root of astragalus radix inhibit the formation of advanced glycation end products. *J Agric Food Chem.* 2009 Sep 9;57(17):7666–72.
230. Kim HY, Kang KS, Yamabe N, Nagai R, Yokozawa T. Protective effect of heat-processed American ginseng against diabetic renal damage in rats. *J Agric Food Chem.* 2007 Oct 17;55(21):8491–7.

231. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care*. 1991 Jan;14(1):68–72.
232. Aoki Y, Yanagisawa Y, Yazaki K, Oguchi H, Kiyosawa K, Furuta S. Protective effect of vitamin E supplementation on increased thermal stability of collagen in diabetic rats. *Diabetologia*. 1992 Oct;35(10):913–6.
233. Rajaobelina K, Féart C, Helmer C, Cougnard-Gregoire A, Merle B, Delcourt C, et al. Adherence to a Mediterranean diet and Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products in older persons: the Three-City study. Poster presented at: European Association for the Study of Diabetes; 2016 Sep 13.
234. Le diabète gestationnel. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 2010 Dec;39(8):S139.
235. Buckley BS, Harreiter J, Damm P, Corcoy R, Chico A, Simmons D, et al. Gestational diabetes mellitus in Europe: prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review: Gestational diabetes mellitus in Europe. *Diabet Med*. 2012 Jul;29(7):844–54.
236. Rey E, Attié C, Bonin A. The effects of first-trimester diabetes control on the incidence of macrosomia. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Jul;181(1):202–6.
237. Clausen TD, Mathiesen E, Ekbom P, Hellmuth E, Mandrup-Poulsen T, Damm P. Poor pregnancy outcome in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005 Feb;28(2):323–8.
238. Sheffield JS, Butler-Koster EL, Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ. Maternal diabetes mellitus and infant malformations. *Obstet Gynecol*. 2002 Nov;100(5 Pt 1):925–30.
239. Cosson E, Cussac-Pillegand C, Benbara A, Pharisien I, Nguyen MT, Chiheb S, et al. Pregnancy adverse outcomes related to pregravid body mass index and gestational weight gain, according to the presence or not of gestational diabetes mellitus: A retrospective observational study. *Diabetes Metab [Internet]*. 2015 Jul [cited 2015 Nov 25]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1262363615000877>
240. Coffeng SM, Blaauw J, Souwer ETD, Rakhorst G, Smit AJ, Graaff R, et al. Skin Autofluorescence as Marker of Tissue Advanced Glycation End-Products Accumulation in Formerly Preeclamptic Women. *Hypertens Pregnancy*. 2011 May;30(2):231–42.
241. Maury E, Savel J, Grouthier V, Rajaobelina K, Corvo L, Lorrain S, et al. Is skin autofluorescence a marker of metabolic memory in pregnant women with diabetes? *Diabet Med*. 2015 Jul;n/a-n/a.
242. Rajaobelina K, Farges B, Nov S, Maury E, Cephise-Velayoudom F, Gin H, et al. Skin autofluorescence and peripheral neuropathy four years later in type 1 diabetes: Skin Autofluorescence and Neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev [Internet]*. 2016 [cited 2016 Oct 7]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.2832>
243. Maury E, Savel J, Grouthier V, Rajaobelina K, Corvo L, Lorrain S, et al. Is skin autofluorescence a marker of metabolic memory in pregnant women with diabetes? *Diabet Med*. 2015 Jul;n/a-n/a.

244. Rajaobelina K, Cougnard-Gregoire A, Delcourt C, Gin H, Barberger-Gateau P, Rigalleau V. Autofluorescence of Skin Advanced Glycation End Products: Marker of Metabolic Memory in Elderly Population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015 Jul 1;70(7):841–6.