



**HAL**  
open science

# Fonction endothéliale et rigidité artérielle, deux intégrateurs du risque cardiovasculaire : Etude à jeun et pendant la période post prandiale chez le sujet sain et le diabétique de type 2

Marinos Fysekidis

► **To cite this version:**

Marinos Fysekidis. Fonction endothéliale et rigidité artérielle, deux intégrateurs du risque cardiovasculaire : Etude à jeun et pendant la période post prandiale chez le sujet sain et le diabétique de type 2. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCD032 . tel-01871598

**HAL Id: tel-01871598**

**<https://theses.hal.science/tel-01871598>**

Submitted on 11 Sep 2018

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

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

**THESE**  
**Pour obtenir le grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**  
**Discipline: BIOLOGIE**

présentée et soutenue publiquement par  
**Marinos FYSEKIDIS**

Le 06/12/2016

**"Fonction endothéliale et rigidité artérielle,  
deux intégrateurs du risque cardiovasculaire.  
Etude à jeun et pendant la période post prandiale  
chez le sujet sain et le diabétique de type 2."**

.

---

Directeur de thèse :  
Emmanuel COSSON

---

JURY

Rapporteur Professeur Jacques Blacher  
Rapporteur Professeur Frank Boccara  
Rapporteur Professeur Yves Boirie  
Examineur Professeur Isabelle Pham  
Examineur Professeur Paul Valensi  
Examineur Professeur Denis Chemla



## REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Paul VALENSI pour m'avoir accueilli dans son service, pour son enseignement initiatique à la recherche, pour son enthousiasme et son aide précieuse, pour ses idées et discussions constructives.

J'exprime également toute ma gratitude au Professeur Emmanuel COSSON, directeur de mon travail de Thèse pour toute son aide directive, attentive, patiente et son enseignement initiatique à la recherche.

J'exprime également toute ma gratitude au Professeur Gérard REACH pour son aide, ses conseils et nos discussions.

Je remercie également les Docteurs Régis COHEN et Michel BOUCHOUCHA MCU-PH pour leurs conseils et leur aide.

Je remercie très respectueusement le Professeur Serge HERCBERG pour son accueil au sein de son laboratoire.

Merci aux amis médecins et secrétaires du Service d'endocrinologie, diabétologie et nutrition de l'hôpital Jean Verdier et Avicenne avec qui j'ai pu passer un meilleur moment.

Merci à mes parents, ma femme, mes enfants, mes proches, mes amis qui m'accompagnent depuis maintenant de nombreuses années.

# LISTE DES ABREVIATIONS

Ach	: Acétylcholine
ACI	: Acceleration Index
ADA	: American Diabetes association
ADMA:	Diméthyl-arginine asymétrique
AIx	: Index d'Augmentation
AIx @75	Index d'Augmentation ajusté sur une FC de 75 battements/minute
ALFEDIAM	: Association de la langue française pour l'étude du diabète et des maladies
AMPK :	Protéine kinase activé par l'adénosine monophosphate
AMS :	Atrophie multisystématisée
ASNМ:	Activité neuronale sympathique musculaire
AOMI :	Artériopathie oblitérante des membres inférieurs
BKCa :	Large-conductance calcium-activated potassium
Bpm	: Battements par minute
BRS	: Sensibilité des baroréflexes
CC	: Cycle Cardiaque
CCK	: Cholécystokinine
CGM	: Continuous Glucose Monitoring
CGRP :	Calcitonin-gene-related peptide
CONGA:	Continuous Overlapping Net Glycemic Action
CV%	: Coefficient of Variation
DD	: Durée de la diastole
DD%	: Durée de la diastole exprimée comme % du cycle cardiaque.
DT1	: Patients diabétiques de type 1
DT2	: Patients diabétiques de type 2
DTI	: Diastolic Time Index (Aire sous courbe diastolique)
E	: Epinephrine
EDI	: Ejection duration indexed
FC	: Fréquence cardiaque
FSC	: Flux Sanguin Cutané
GIP	: Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP1	: Glucagon-like peptide-1
GRP	: Gastrin Releasing Polypeptide
HBGI	: High Blood Glucose index
HED	: Methoxyephedrine-[ <sup>11</sup> C]
HF	: Bande haute fréquence
HF-FC:	Pics de haute fréquence des variations de fréquence cardiaque
HF-PAS :	Pics de haute fréquence des variations de la pression artérielle systolique
HGPO :	Charge en glucose par voie orale
HPP	: Hypotension postprandiale
IC	: Index de contractilité
ID	: Intra duodénale
IGT	: Intolérants au glucose
LBGI	: Low Blood Glucose Index
LF	: Bande basse fréquence
LF/HF :	Rapport des variations
LF-FC :	Pics de basses fréquences des variations de fréquence cardiaque
LF-PAS :	Pics de hautes fréquences des variations de la pression artérielle
LI	: Lability Index
LVET :	Left Ventricular Ejection Time
LVWI :	Left Ventricular Work Indexed
MAG	: Mean Absolute Glucose

MAGE:	Mean Amplitude of Glycemic Excursions
MBG :	Mean Blood Glucose
MIBG :	Métaiodobenzylguanidine-[ <sup>123</sup> I]
NAC :	Neuropathie autonome cardiaque
NE :	Norépinephrine
NGT	Sujets avec une Normoglycémie
NO :	Oxyde nitrique
NOS :	Synthase de l'Oxide Nitrique
PA :	Pression artérielle
PACAP:	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAD :	Pression artérielle diastolique
PAS :	Pression artérielle systolique
PAS_C :	Pression artérielle systolique centrale
PAS_P:	Pression artérielle systolique peripherique
PPC :	Pression Pulsée Centrale
PPG :	Post Prandial Glucose
PPP :	Pression Pulsée Peripherique
RHI :	Reactive hyperemia index
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
SD :	Standard Deviation
SI :	Stroke volume indexed
SNA :	Système nerveux végétatif ou autonome
SPECT :	Tomographie par émission de photon unique
SV :	Stroke volume
TAF :	Test au froid
TFC :	Total Fluid Content
TPR :	Total peripheral resistance
TPRI :	Total peripheral resistance indexed
Tr :	Temps de réflexion
TTI :	Systolique Time Index (Aire sous courbe systolique)
VFC :	Variabilité de la fréquence cardiaque
VIP :	Peptide intestinal vasoactif
VOP :	Vitesse de l'onde de pouls

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>SYNTHESE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>ENDOTHELIUM</b> .....	<b>21</b>
2.1.1	<i>Physiologie</i> .....	21
2.1.1.1	Voies métaboliques des cellules endothéliales.....	22
2.1.1.1.1	Glucose.....	22
2.1.1.1.2	Acides gras.....	22
2.1.1.1.3	Acides aminés.....	23
2.1.1.1.4	AMPK et détection d'énergie intracellulaire .....	23
2.1.1.1.5	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), angiogénèse et flux glycolytique 23	
2.1.1.1.6	Diabète et produits de glycation avancée (AGE) .....	23
2.1.1.2	Rôle de l'insuline et de l'insulino-résistance.....	24
2.1.1.2.1	Transport transendothélial de l'insuline.....	24
2.1.1.2.2	Insulinorésistance et défaut de la signalisation insulinique : effet sur le recrutement capillaire.....	24
2.1.1.3	Diabète et voies métaboliques impliquées dans la dysfonction des cellules endothéliales.....	25
2.1.1.3.1	Diabète et espèces d'oxygène réactif (ROS).....	25
2.1.1.3.2	Diabète, signalisation insulinique et effet protecteur ou délétère de l'insulinothérapie .....	26
2.1.2	<i>Techniques d'exploration de la fonction endothéliale</i> .....	28
2.1.2.1	Principe général.....	28
2.1.2.2	Perfusion de substances vaso-actives.....	28
2.1.2.3	Dilatation médiée par le flux .....	28
2.1.2.3.1	EndoPAT .....	29
2.1.2.3.2	Comparaison des différents tests.....	30
2.1.3	<i>Biomarqueurs</i> .....	31
2.1.4	<i>Déterminants</i> .....	32
2.1.5	<i>Pronostic</i> .....	32
2.1.5.1	Informations pronostiques en plus des scores de risque couramment utilisés en prévention primaire.....	32
2.1.5.2	Intérêt pronostique dans la prévention secondaire. ....	33
2.1.5.3	Réponse au traitement .....	33
2.1.6	<i>La fonction endothéliale microvasculaire et macrovasculaire sont-elles comparables?</i> .....	34
2.1.7	<i>Résumé</i> .....	35
<b>2.2</b>	<b>LA MICROCIRCULATION CUTANEE</b> .....	<b>36</b>
2.2.1	<i>Physiologie</i> .....	36
2.2.1.1	Anatomie vasculaire .....	36
2.2.1.2	Tonus vasoconstricteur cutané .....	36
2.2.1.3	Vasodilatation cutanée .....	37
2.2.2	<i>Méthodes d'exploration</i> .....	38
2.2.2.1	Etude de la fonction microvasculaire sous cutanée par laser doppler.....	38
2.2.2.2	Imagerie de contraste utilisant la granularité laser (SPECKLE).....	39
2.2.2.3	<i>Méthodes de stimulation non pharmacologiques</i> .....	40
2.2.2.3.1	Hyperémie post-ischémique .....	40
2.2.2.3.2	Hyperémie thermique .....	40
2.2.2.3.3	Autres.....	41
2.2.2.4	Méthodes pharmacologiques.....	43
2.2.2.4.1	Administration par iontophorèse de l'acétylcholine .....	43
2.2.2.4.2	Administration de NO par microdialyse.....	43

2.2.2.5	Analyse spectrale vasomotrice .....	44
2.2.2.5.1	Autres.....	45
2.2.3	<i>Limites et problèmes techniques du laser Doppler</i> .....	47
2.2.3.1	Mesure de flux sanguin cutané plutôt que la vraie perfusion sanguine tissulaire. 47	
2.2.3.2	Absence du zéro biologique .....	47
2.2.3.3	Variabilité spatiale.....	47
2.2.3.4	Reproductibilité .....	48
2.2.4	<i>Déterminants</i> .....	48
2.2.5	<i>Pronostic</i> .....	48
2.2.6	<i>Résumé</i> .....	50
<b>2.3</b>	<b>RIGIDITE ARTERIELLE.....</b>	<b>51</b>
2.3.1	<i>Physiologie</i> .....	51
2.3.1.1	Système circulatoire artériel .....	51
2.3.1.2	Conséquences .....	52
2.3.1.3	Phénomène d'amplification des pressions pulsées.....	52
2.3.1.4	Variabilité de l'amplification des pressions pulsées .....	53
2.3.2	<i>Exploration clinique de la rigidité artérielle</i> .....	53
2.3.2.1	Mesure de la vitesse de l'onde de pouls aortique.....	53
2.3.2.2	Evaluation de l'onde de pouls central.....	54
2.3.2.3	Evaluation de l'Index d'Augmentation .....	56
2.3.2.4	Index d'Augmentation et fréquence cardiaque.....	56
2.3.2.5	Dissociation entre l'Index d'augmentation et la VOP .....	56
2.3.3	<i>Déterminants de la rigidité artérielle</i> .....	59
2.3.3.1	DT1.....	59
2.3.3.2	Syndrome métabolique .....	59
2.3.3.3	DT2.....	60
2.3.3.4	Facteurs nutritionnels .....	60
2.3.3.5	Insuline et Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1). .....	65
2.3.4	<i>Déterminants de l'amplification des pressions pulsées</i> .....	66
2.3.4.1	Déterminants non modifiables .....	66
2.3.4.2	Déterminants modifiables .....	66
2.3.5	<i>Pronostic cardiovasculaire</i> .....	68
2.3.5.1	Pression artérielle centrale : organes cibles et mortalité.....	68
2.3.5.2	VOP et mortalité.....	68
2.3.5.3	Aix et mortalité.....	70
2.3.5.4	Implications pour l'intervention médicamenteuse .....	70
2.3.6	<i>Résumé</i> .....	72
<b>2.4</b>	<b>LE SYSTEME NERVEUX VEGETATIF OU AUTONOME (SNA).....</b>	<b>74</b>
2.4.1	<i>Physiologie</i> .....	74
2.4.1.1	Architecture du SNA.....	74
2.4.1.1.1	Voies afférentes .....	74
2.4.1.1.2	Voies efférentes.....	74
2.4.1.2	Régulation du SNA cardiovasculaire .....	78
2.4.1.2.1	L'arythmie respiratoire sinusale.....	78
2.4.1.2.2	Barorécepteurs .....	79
2.4.1.3	Régulation à court terme de la pression artérielle.....	79
2.4.1.4	Régulation gastro-intestinale et SNA.....	80
2.4.1.4.1	Fonction sécrétoire .....	80
-	Sécrétion salivaire .....	80
-	Digestion acide : sécrétion gastrique .....	80
-	Digestion alcaline : sécrétion pancréatique et biliaire. ....	81
-	Sécrétion intestinale et absorption .....	81
2.4.1.4.2	Organisation de la motricité intestinale .....	82



2.4.2	<i>Méthodes d'exploration du SNA cardiovasculaire</i> .....	84
2.4.2.1	Recherche clinique de la neuropathie autonome cardiaque .....	84
2.4.2.1.1	Epreuve de respiration profonde.....	84
2.4.2.1.2	Epreuve d'orthostatisme .....	84
2.4.2.1.3	Epreuve de Valsalva .....	85
2.4.2.1.4	L'hypotension orthostatique .....	86
2.4.2.1.5	Epreuve «handgrip» .....	86
2.4.2.2	Mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque .....	86
2.4.2.2.1	Analyse spectrale de la variabilité de la FC. ....	86
2.4.2.2.2	Analyse suivant la durée de l'enregistrement .....	88
	-Enregistrements courts .....	88
	-Enregistrements sur 24 heures .....	88
2.4.2.3	Mesure de la variabilité de la pression artérielle.....	89
2.4.2.4	Sensibilité des baroréflexes (BRS).....	90
2.4.2.4.1	Méthodologie de mesure de la BRS. ....	90
2.4.2.4.2	Méthodes utilisées pour évaluer le baroréflexe .....	90
	- Changements de la PA induits par l'administration des médicaments.....	90
	- Changements de la PA induits par des manœuvres physiques .....	91
	- Fluctuations spontanées de la PA .....	91
2.4.2.5	Evaluation par mesure de l'activité neuronale sympathique musculaire (ASNM) 92	
2.4.2.6	Catécholamines .....	93
2.4.2.7	Imagerie du SNA cardiaque. Techniques et définition des indices scintigraphiques.....	93
2.4.3	<i>Données chez les diabétiques</i> .....	95
2.4.3.1	Variabilité de la FC et diabète.....	95
2.4.3.2	Précision diagnostique de la mesure de la sensibilité du baroréflexe (BRS) chez les patients atteints de diabète.....	95
2.4.3.3	Diabète et mesures d'activité neuronale sympathique musculaire (ASNM) 96	
2.4.3.4	Diabète et dosage des catécholamines .....	96
2.4.3.4.1	Changements de posture .....	96
2.4.3.4.2	Exercice .....	96
2.4.3.4.3	Hypoglycémie.....	97
2.4.3.4.4	Poignée soutenue (sustained handgrip) .....	97
2.4.3.4.5	Test au froid, manœuvre de Valsalva et stress mental .....	97
2.4.3.5	Applications de la neuroimagerie dans le diabète .....	98
2.4.3.6	Diabète et manifestations cliniques de la NAC.....	98
2.4.3.6.1	Épidémiologie de la NAC.....	98
2.4.3.6.2	NAC et paramètres métaboliques .....	99
2.4.3.6.3	Tachycardie de repos .....	99
2.4.3.6.4	Intolérance à l'activité physique .....	99
2.4.3.6.5	Hypotension orthostatique .....	99
2.4.3.6.6	Syndrome de tachycardie ou bradycardie après l'orthostatisme.....	99
2.4.4	<i>Pronostic cardiovasculaire</i> .....	100
2.4.4.1	FC, variabilité de la FC et risque de mortalité .....	100
2.4.4.2	A SNM et insuffisance cardiaque.....	100
2.4.4.3	Imagerie du SNA cardiaque et pronostic cardiovasculaire .....	100
2.4.4.4	NAC et ischémie myocardique et risque de mortalité.....	100
2.4.4.5	NAC et événements cardiovasculaires .....	101
2.4.4.6	NAC et insuffisance cardiaque.....	101
2.4.4.7	NAC et rigidité artérielle.....	101
2.4.4.8	NAC et instabilité cardiovasculaire per- et péri-opératoire.....	102
2.4.5	<i>Résumé</i> .....	103
<b>2.5</b>	<b>FACTEURS DETERMINANTS DU DEBIT CARDIAQUE</b> .....	<b>105</b>

2.5.1	<i>Physiologie</i> .....	105
2.5.2	<i>Rôle prépondérant de la FC</i> .....	105
2.5.3	<i>Déterminants de la contractilité</i> .....	107
2.5.4	<i>Déterminants de la FC intrinsèque chez l'homme</i> .....	107
2.5.5	<i>Mesure du débit cardiaque avec l'utilisation de l'impédance cardiaque</i> .....	108
<b>2.6</b>	<b>LES MODIFICATIONS POST PRANDIALES : UN MODELE INTEGRANT LE TUBE DIGESTIF, LES SIGNAUX HORMONAUX ET LA REPONSE CARDIOVASCULAIRE.</b> .....	<b>110</b>
2.6.1	<i>Physiologie</i> .....	110
2.6.1.1	Fonction gastro-intestinale postprandiale.....	110
2.6.1.2	Modifications hémodynamiques postprandiales.....	111
2.6.1.2.1	Réflexe gastrovasculaire: distension gastrique, activation sympathique post prandiale et PA .....	111
2.6.1.2.2	Activation sympathique post prandiale .....	114
2.6.1.2.3	Hypotension postprandiale .....	114
2.6.1.2.4	Microcirculation .....	115
2.6.1.2.5	Rigidité artérielle .....	115
2.6.1.2.6	Fonction Endothéliale.....	116
2.6.1.2.7	Activation sympathique post prandiale .....	116
	-Activité sympathique musculaire post prandiale .....	116
	-Equilibre sympatho-vagal cardiaque post-prandial .....	117
	-Effet de l'ingestion de l'eau .....	117
	-Effets des glucides sur l'ASNM .....	118
	-Effets des lipides sur l'ASNM.....	118
2.6.2	<i>Hormones et SNA</i> .....	120
2.6.2.1	Catécholamines et SNA .....	120
2.6.2.1.1	Catécholamines et métabolisme glucidique .....	120
2.6.2.1.2	Catécholamines et tissu adipeux.....	121
2.6.2.1.3	Catécholamines et thermogenèse.....	121
2.6.2.1.4	Catécholamines et îlots pancréatiques .....	122
2.6.2.1.5	Insuline et SNA .....	123
2.6.2.2	GLP1 et SNA .....	129
2.6.3	<i>PA post prandiale</i> .....	131
2.6.3.1	PA et glucose.....	131
2.6.3.2	PA et autres types d'hydrates de carbone.....	132
2.6.3.3	PA et graisses par voie orale, intraduodénale et intraveineuse. ....	132
2.6.3.4	PA post-prandiale et médicaments agissant au niveau du tube digestif....	133
2.6.4	<i>Diabète et et autres situations pathologiques</i> .....	134
2.6.4.1	<i>Fonction endothéliale</i> .....	134
2.6.4.2	<i>Microcirculation et analogues insuliniques</i> .....	134
2.6.4.3	Autres situations pathologiques .....	135
2.6.5	<i>Mécanismes neuronaux ou hormonaux?</i> .....	136
2.6.6	<i>Résumé</i> .....	137
<b>3</b>	<b>TRAVAUX PERSONNELS-QUESTIONS POSEES</b> .....	<b>139</b>
<b>3.1</b>	<b>CONTRIBUTION DE LA GLYCEMIE POST PRANDIALE SUR L'EXPOSITION GLYCEMIQUE CHEZ DES SUJETS SANS DYSGLYCEMIE CONNUE</b> .....	<b>141</b>
3.1.1	<i>Introduction</i> .....	141
3.1.1.1	Glycémie post prandiale et pronostique cardio-vasculaire .....	141
3.1.1.1.1	Sujets sans diabète.....	141
3.1.1.1.2	Sujets ayant un diabète .....	141
3.1.1.2	Autosurveillance glycémique et Mesure du Glucose en Continu (MGC) 142	
3.1.1.3	Mesure du Glucose en Continu .....	143
3.1.1.4	Précision et évènements indésirables .....	143
3.1.1.5	Description du système de la MGC .....	144

3.1.1.6	Évaluation de la contribution absolue et relative des glycémies postprandiales à l'HbA1c chez des patients diabétiques de type 2.....	145
3.1.2	<i>Mise au point d'une méthode d'étude de la glycémie en période post prandiale utilisant un holter glycémique. Etude chez des patients obèses.</i> .....	147
3.1.2.1	Objectif.....	147
3.1.2.2	Méthodes.....	147
3.1.2.2.1	Patients .....	147
3.1.2.2.2	Hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO).....	148
3.1.2.2.3	Holter Glycemique (CGM) .....	148
3.1.2.2.4	Analyses statistiques.....	149
3.1.2.3	Résultats .....	149
3.1.2.3.1	Contribution de la glycémie post prandiale (PPG).....	149
3.1.2.3.2	Variabilité glycémique .....	151
3.1.3	<i>Comparaison de la cinétique glycémique entre un petit déjeuner standardisé et une charge orale en glucose.</i> .....	161
3.1.3.1	Influence d'un repas mixte <i>versus</i> influence d'une charge orale en glucose 161	
3.1.3.2	Etude de la glycémie post prandiale utilisant un holter glycémique. HGPO <i>versus</i> petit déjeuner standardisé.....	162
3.1.3.3	Résultats HGPO vs petit déjeuner standardisé.....	162
3.1.3.4	Discussion .....	164
3.1.3.5	Conclusion.....	165
<b>3.2</b>	<b>ETUDE DE LA REPOSE HEMODYNAMIQUE PHYSIOLOGIQUE POST PRANDIALE CHEZ DES SUJETS SANS FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE. ETUDE NUTRIVASC DE TYPE EXPOSES / NON EXPOSES "NICHEE DANS LA COHORT" SU.VI.MAX2.....</b>	<b>166</b>
3.2.1	<i>Description de l'étude. Hypothèse de travail. Objectifs</i> .....	166
3.2.1.1	Objectif principal.....	166
3.2.1.2	Objectif secondaire.....	166
3.2.1.3	Exposé du plan expérimental .....	166
3.2.1.4	Populations étudiées.....	167
3.2.1.5	Type d'essai.....	168
3.2.1.6	Retombées attendues .....	168
3.2.1.7	Sélection des personnes.....	168
3.2.1.7.1	Critères d'inclusion.....	168
3.2.1.7.2	Critères de non-inclusion.....	169
3.2.1.8	Description du mode de recrutement.....	169
3.2.1.9	Critères de jugement.....	169
3.2.1.9.1	Critères primaires .....	169
3.2.1.9.2	Critères secondaires .....	170
3.2.1.10	Durée de l'étude .....	170
3.2.1.11	Présélection .....	171
3.2.1.12	Inclusion .....	173
3.2.1.13	Visite .....	174
3.2.1.14	Prise d'un petit déjeuner standardisé.....	176
3.2.1.15	Explorations biologiques.....	177
3.2.1.16	Analyse statistique des données .....	178
3.2.1.16.1	Calcul d'effectif.....	178
3.2.1.16.2	Description du plan d'analyses statistiques .....	179
3.2.1.16.3	Analyse des critères principaux .....	179
3.2.1.16.4	Analyse des critères secondaires .....	180
3.2.2	<i>Résultats</i> .....	181
3.2.2.1	Caractéristiques de la population NUTRIVASC .....	181
3.2.2.2	Résultats à jeun (H0) .....	181
3.2.2.2.1	Biologie. ....	181

3.2.2.2.2	Pression et rigidité artérielles. Cycles cardiaque. Données fournis par le Sphygmocor® .....	181
3.2.2.2.3	Activité autonome cardiovasculaire. Paramètres hémodynamiques. Données fournis par le Task Force Monitor®.....	181
3.2.2.2.4	Activité autonome cardiovasculaire et paramètres hémodynamiques..	181
3.2.2.2.5	Fonction endothéliale. Données fournis par ENDOPAT® et PERIMED®	181
3.2.2.3	Résultats en post prandial.....	213
3.2.2.3.1	Biologie. ....	213
3.2.2.3.2	Paramètres hémodynamiques et activité autonome cardiovasculaire...	215
3.2.2.3.3	Pression et rigidité artérielle .....	217
3.2.2.3.4	Fonction endothéliale (ENDOPAT®).....	222
3.2.2.3.5	Flux sanguin cutané .....	223
3.2.3	Conclusions .....	224
<b>3.3</b>	<b>ETUDE DE LA REPOSE HEMODYNAMIQUE PHYSIOLOGIQUE POST PRANDIALE CHEZ DES PATIENTS DIABETIQUES AYANT DES FACTEURS DE RISQUE CARDIOVASCULAIRE AVANT ET APRES UNE INSULINOTHERAPIE. ETUDE INSUVASC.....</b>	<b>225</b>
3.3.1	Description de l'étude.....	225
3.3.1.1	Traitement .....	227
3.3.1.2	Critères d'inclusion: .....	228
3.3.1.3	Critères de non inclusion:.....	228
3.3.1.4	Organisation d'une demi-journée d'explorations.....	229
3.3.1.5	Analyses statistiques .....	231
3.3.1.5.1	Analyse descriptive.....	231
3.3.1.5.2	Nombre prévu de personnes à inclure dans la recherche.....	231
3.3.1.5.3	Degré de signification statistique prévu .....	231
3.3.1.6	Population .....	232
3.3.2	Résultats .....	233
3.3.2.1	Microcirculation: Flux sanguin cutané avant et après insulinothérapie .....	233
3.3.2.2	Introduction.....	233
3.3.2.3	Patients.....	234
3.3.2.4	Mesures des fluctuations spontanées du flux sanguin par laser doppler ....	235
3.3.2.5	Dosages biochimiques .....	235
3.3.2.6	Analyse du FSC. ....	236
3.3.2.7	Résultats .....	237
3.3.2.7.1	Traitement par insuline .....	237
3.3.2.7.2	Paramètres métaboliques .....	237
3.3.2.7.3	FSC à jeun et post prandial avant la randomisation (V1).....	238
3.3.2.7.4	Changements du FSC après 4 semaines de traitement par l'insuline (V2)	238
3.3.2.7.5	Marquers biologiques du stress oxydatif et de la fonction endothéliale	239
3.3.2.7.6	Les corrélations des changements du CBF et des paramètres métaboliques.....	239
3.3.2.8	Discussion .....	239
3.3.3	Petites artères: amélioration de la fonction endothéliale après l'insulinothérapie	272
3.3.4	Le ratio de viabilité sousendocardique est inversement corrélé aux taux de leptine chez les diabétiques de type 2 avant et après traitement à l'insuline. ....	273
3.3.5	Le traitement insulinique atténue les différences de la durée de diastole liées à l'activité vagale cardiaque indépendamment de la FC .....	276
3.3.6	Modifications de l'activité sympathique cardio-vasculaire sous insulinothérapie chez les diabétiques de type 2 et HTA .....	279
3.3.6.1	Objectif.....	279

3.3.6.2	Résultats .....	279
3.3.7	Traitement par insuline, rigidité artérielle, fonction endothéliale et HTA .....	285
<b>3.4</b>	<b>COMPARAISON DES INTEGRATEURS DU RISQUE CARDIOVASCULAIRE ENTRE LES SUJETS SAINS DE L'ETUDE NUTRIVASC VS LES PATIENTS DIABETIQUES DE L'ETUDE INSUVASC (VISITE 1) .....</b>	<b>288</b>
3.4.1	Objectif.....	288
3.4.2	Caractéristiques des deux groupes .....	288
3.4.3	Résultats à jeun (H0).....	289
3.4.3.1	Biologie .....	289
3.4.3.2	Rigidité artérielle.....	289
3.4.3.3	Fonction endothéliale (petites artères) et flux sanguin cutané .....	290
3.4.4	Résultats pendant la période post prandiale.....	291
3.4.4.1	Biologie .....	291
3.4.4.2	Rigidité artérielle.....	291
3.4.4.3	Fonction endothéliale (petites artères) et flux sanguin cutané .....	295
3.4.5	Conclusions .....	297
<b>3.5</b>	<b>NEUROPATHIE ET NAC EFFET SUR LA RIGIDITE ARTERIELLE.....</b>	<b>298</b>
3.5.1	Introduction.....	298
3.5.2	Objectif.....	298
3.5.3	Méthodes .....	298
3.5.3.1	Patients .....	298
3.5.3.2	Mesure de la VOP .....	299
3.5.3.3	Mesure des pressions centrales .....	299
3.5.4	Résultats .....	299
3.5.5	Discussion .....	300
<b>3.6</b>	<b>ÉLASTICITE HEPATIQUE ET RIGIDITE ARTERIELLE.....</b>	<b>311</b>
3.6.1	Introduction.....	311
3.6.2	Vitesse de l'onde de Pouls (VOP) et mortalité .....	313
3.6.3	Objectif.....	315
3.6.4	Mesure de la fibrose hépatique : le Fibroscan .....	315
3.6.5	Méthodes .....	315
3.6.6	Analyses statistiques.....	316
3.6.7	Résultats .....	317
3.6.8	Conclusion.....	320
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>323</b>
<b>5</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>329</b>
5.1.1	Paramètres mesurés et calculés par Sphygmocor.....	329
5.1.2	Variables mesurés par impédancemétrie cardiaque (ICG) .....	332
5.1.3	Etude ACCES - Résumé.....	335
<b>6</b>	<b>REFERENCES .....</b> ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.	

## Liste des tableaux

Tableau 1: <i>Techniques utilisées pour la fonction endothéliale.</i> .....	31
Tableau 2: <i>Tests microvasculaires non invasives sans intervention pharmacologique.</i> .....	42
Tableau 3: <i>Tests microvasculaires non invasifs avec intervention pharmacologique.</i> .....	46
Tableau 4: <i>Index d'Augmentation et VOP</i> .....	58
Tableau 5: <i>Rigidité artérielle et produits nutritionnels.</i> .....	61
Tableau 6: <i>Rigidité artérielle vitamines et micronutriments.</i> .....	63
Tableau 7: <i>Rigidité artérielle et nutriments végétales</i> .....	64
Tableau 8: <i>Etudes de mortalité et VOP.</i> .....	69
Tableau 9: <i>Traitements antihypertenseurs et rigidité artérielle</i> .....	71
Tableau 10: <i>Activité du SNA et spécificité tissulaire.</i> .....	76
Tableau 11: <i>Caractéristiques des neurotransmetteurs</i> .....	77
Tableau 12: <i>Composants de la variabilité de pression artérielle</i> .....	89
Tableau 13: <i>Effets du SNA sur le coeur.</i> .....	106
Tableau 14: <i>NUTRIVASC Explorations biologiques.</i> .....	178
Tableau 15: <i>NUTRIVASC résultats biologiques en post prandial. Q1 vs Q4</i> .....	213
Tableau 16: <i>INSUVASC Description de la population</i> .....	232
Tableau 17: <i>NUTRIVASC et INSUVASC caractéristiques des deux groupes.</i> .....	288
Tableau 18: <i>NUTRIVASC et INSUVASC biologie à H0 pour les deux groupes</i> .....	289
Tableau 19: <i>NUTRIVASC et INSUVASC rigidité artérielle</i> .....	289
Tableau 20: <i>NUTRIVASC et INSUVASC fonction endothéliale et microcirculation.</i> ....	290
Tableau 21: <i>NUTRIVASC et INSUVASC Paramètres métaboliques en post prandial.</i> ..	291
Tableau 22: <i>Etudes du risque cardiovasculaire chez des patients avec NASH.</i> .....	312
Tableau 23: <i>Récapitulatif des études qui ont trouvé une association entre la VOP et les événements cardiovasculaires</i> .....	314
Tableau 24: <i>Caractéristiques de notre cohorte.</i> .....	317
Tableau 25: <i>Paramètres hémodynamiques</i> .....	318
Tableau 26: <i>Rigidité artérielle et fibrose hépatique.</i> .....	318
Tableau 27: <i>Paramètres de l'onde centrale.</i> .....	330
Tableau 28: <i>Index d'augmentation et SEVR.</i> .....	331

## Liste des figures

Figure 1: <i>Diabète, signalisation insulinique et effet de l'insulinothérapie.</i> .....	26
Figure 2: <i>Enregistrements EndoPAT</i> .....	29
Figure 3: <i>Capteurs EndoPAT</i> .....	30
Figure 4: <i>Imagerie de contraste utilisant la granularité laser.</i> .....	39
Figure 5: <i>Hyperémie thermique.</i> .....	41
Figure 6: <i>Transformation de Fourier</i> .....	44
Figure 7: <i>Pouls périphérique (Radiale) et centrale (Aorte)</i> .....	55
Figure 8: <i>Epreuves pour le diagnostic de la NAC</i> .....	85
Figure 9: <i>Transformée en spectre</i> .....	87
Figure 10: <i>Relation entre le débit cardiaque et ses déterminants</i> .....	105
Figure 11: <i>Effets des variations de la FC et débit Cardiaque</i> .....	106
Figure 12: <i>Facteurs déterminants de la contractilité cardiaque</i> .....	107
Figure 13: <i>Le signal d'impédance cardiaque (ICG)</i> .....	109
Figure 14: <i>Activation sympathique post prandiale chez les sujets sains.</i> .....	112
Figure 15: <i>Activation sympathique post prandiale chez les sujets âgés.</i> .....	113
Figure 16 : <i>Mécanismes de l'effet hyperglycémiant des catécholamines</i> .....	120
Figure 17: <i>Absorption intestinale du glucose</i> .....	131
Figure 18: <i>Absorption intestinale des graisses. (Dr Bouchoucha)</i> .....	132
Figure 19 : <i>Protocole de l'étude CGM</i> .....	148
Figure 20: <i>Enregistrement CGM de 24 heures</i> .....	150
Figure 21: <i>Comparaison des enregistrements CGM après HGPO (OgTT) et petit-déjeuner</i> .....	163
Figure 22: <i>NUTRIVASC recrutement, potentiel et présélection</i> .....	172
Figure 23: <i>NUTRIVASC schéma du score de la présélection</i> .....	173
Figure 24: <i>NUTRIVASC Série d'explorations sur une heure</i> .....	176
Figure 25: <i>NUTRIVASC protocole d'explorations sur une demi-journée.</i> .....	177
Figure 26: <i>NUTRIVASC Paramètres biologiques en post prandial</i> .....	214
Figure 27: <i>NUTRIVASC Modifications postprandiales de la FC, du DC, et du volume d'ejection</i> .....	215
Figure 28: <i>NUTRIVASC Modifications des résistances périphériques, du retour veineux et de la contractilité cardiaque</i> .....	216
Figure 29: <i>NUTRIVASC Les modifications de la FC ne coïncident pas avec l'inhibition vagale</i> .....	217
Figure 30: <i>NUTRIVASC Modifications postprandiales de la PAS, PAD et PP périphérique et centrale. Données fournis par le Sphygmocor®.</i> .....	219
Figure 31: <i>NUTRIVASC modifications postprandiales de la FC, PPAR et Tr</i> .....	220
Figure 32: <i>NUTRIVASC Modifications postprandiales de la VOP, AIX, AIX@75, SEVR, durée de la diastole</i> .....	221
Figure 33: <i>NUTRIVASC RHI et AIX@75.</i> .....	222
Figure 34: <i>NUTRIVASC Flux sanguin cutané et % de variation pendant la respiration profonde</i> .....	223
Figure 35: <i>INSUVASC Schéma de l'étude</i> .....	226
Figure 36: <i>INSUVASC Explorations pendant une période d'une heure.</i> .....	230
Figure 37: <i>INSUVASC analyse du FSC</i> .....	236
Figure 38 : <i>INSUVASC RHI pour tous les patients et pour les 3 bras de traitement</i> .....	272
Figure 39: <i>INSUVASC Taux plasmatique de la leptine et de l'adiponectine à V1 et V2...</i>	273
Figure 40: <i>INSUVASC FC, SEVR, durée de la diastole et durée de la diastole ajusté pour la FC</i> .....	274
Figure 41: <i>INSUVASC Corrélacion entre la leptine et SEVR ajusté sur la FC à V1 et V2</i> .....	275
Figure 42: <i>INSUVASC Corrélacion entre la durée de la diastole et la FC</i> .....	276
Figure 43: <i>INSUVASC Evolution de FC en post prandial</i> .....	276

Figure 44: INSUVASC %Durée de la diastole ajusté sur la FC.....	277
Figure 45: INSUVASC FC et %DD selon l'activité vagale pendant la V1.....	277
Figure 46: INSUVASC FC après traitement par insuline. ....	278
Figure 47: INSUVASC %DD après traitement par insuline.....	278
Figure 48: INSUVASC FC et %DD selon l'activité vagale après traitement par insuline	278
Figure 49: INSUVASC Modifications hémodynamiques.....	280
Figure 50: INSUVASC Evolution de la balance sympatho-vagale V1 et V2. ....	280
Figure 51: INSUVASC Analyse spectrale à V1. ....	281
Figure 52: INSUVASC V2, analyse spectrale de la variabilité de la FC.....	282
Figure 53: INSUVASC V1 et V2, analyse spectrale de la variabilité de la FC pour les normotendus vs hypertendus.....	283
Figure 54: INSUVASC Aire sous le courbe LF-PAS V1 vs V2, *p<0.05 .....	283
Figure 55: Réponse autonome cardiaque dans les études INSUVASC et NUTRIVASC ..	284
Figure 56: INSUVASC Résultats sur la FC, PAS radiale,PAS Aortique et PA moyenne.	285
Figure 57: INSUVASC Pressions pulsées périphériques et centrales, ratio d'augmentation des pressions pulsées et le de réflexion de l'onde incidente .....	286
Figure 58: INSUVASC SEVR, AIx@75, VOP et RHI. ....	287
Figure 59: NUTRIVASC et INSUVASC. FC, Pressions systoliques et pulsées artérielles périphériques et centrales.....	292
Figure 60: NUTRIVASC et INSUVASC Augmentation des pressions pulsées, indice de perfusion myocardique et durée de diastole .....	293
Figure 61: NUTRIVASC et INSUVASC :Index d'augmentation périphérique et centrale ajusté sur la FC, temps de réflexion de l'onde incidente et VOP .....	294
Figure 62: NUTRIVASC et INSUVASC. Fonction endothéliale et FSC. ....	295
Figure 63 : NUTRIVASC et INSUVASC Représentation des résultats de l'index d'augmentation obtenus par Sphygmocor et avec l'ENDOPAT .....	296
Figure 64: Principe du Fibroscan. ....	315
Figure 65: Corrélation entre VOP et élasticité hépatique. ....	319
Figure 66: Corrélation entreVOP et élasticité hépatique chez les normotendus.....	319
Figure 67: Corrélations entre VOPet élasticité hépatique chez les hypertendus.....	320
Figure 68: Hypothèse physiopathologique.....	322
Figure 69: Probable mécanisme de l'accélération de la FC .....	324
Figure 70: Résultats de l'étude NUTRIVASC.....	325
Figure 71: Résultats de l'étude INSUVASC. ....	326
Figure 72 : Nutrivasc vs INSUVASC (V1) résultats .....	327
Figure 73: Schéma de l'étude ACCES .....	337



# Première partie

## 1 Introduction

Malgré une diminution régulière observée depuis 30 ans, la mortalité cardio-vasculaire reste dans les pays industrialisés une des premières causes de mortalité. Ainsi en 2003, 32% des décès enregistrés en France étaient liés à une pathologie cardio-vasculaire [7]. Elle est due à l'exposition de plus en plus fréquente à l'obésité, au tabac, au diabète ou aux stades prédiabétiques comme l'intolérance au glucose, à l'hypertension artérielle (HTA) ou à la dyslipidémie qui s'intègrent dans le syndrome métabolique.

Actuellement, explorer la rigidité artérielle, l'endothélium vasculaire, la microcirculation et la balance vago-sympathique cardiaque permet d'intégrer la durée et le degré d'exposition aux facteurs de risque et d'estimer le pronostic cardiovasculaire.

L'objectif de cette thèse était d'étudier ces anomalies d'organes cibles dans un continuum de pathologies métaboliques (chez des sujets sans facteur de risque et chez des patients diabétiques), à jeun et en post prandial.

Les paramètres que nous étudions sont considérés comme des intégrateurs de risque cardiovasculaire :

- L'endothélium joue un rôle majeur dans la physiologie vasculaire. Sa position anatomique stratégique entre sang et cellules musculaires lisses ne fait pas de lui une simple interface. C'est également une véritable glande aux fonctions multiples. Tout d'abord, il a un rôle essentiel sur le tonus vasculaire en permettant la régulation du flux sanguin et une perfusion tissulaire optimale. Ensuite, il participe activement au processus de coagulation. Enfin, l'endothélium a une action régulatrice sur la croissance et la migration des autres cellules de la paroi vasculaire.

Dans le système microcirculatoire, la vasodilatation est un phénomène qui témoigne de la bonne fonction endothéliale et qui se trouve sous l'action des nerfs sympathiques vasodilatateurs. La vasodilatation cutanée permet surtout la dissipation de la chaleur mais est essentielle pour le transport des nutriments. L'étude des facteurs impliqués dans la fonction endothéliale a été réalisée après l'administration par iontophorèse d'agonistes et d'antagonistes in vivo sans crainte d'effets secondaires systémiques, ce qui a nous a permis de mieux connaître sa physiologie.

Le rôle physiologique de l'endothélium des grandes artères et des artères de résistance est très différent. La réduction de la libération d'oxyde nitrique (NO) joue un rôle central dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale dans les grandes artères, d'autre part le NO dans la microcirculation a comme objectif principal de moduler le métabolisme tissulaire. Les facteurs métaboliques sont probablement plus importants dans la régulation de la fonction microvasculaire.

- La rigidité artérielle est un prédicteur indépendant d'événements cardio-vasculaires dans la population générale, chez les patients hypertendus, en insuffisance rénale terminale, intolérants au glucose et ayant une pathologie coronarienne. L'arbre artériel consiste en un tube visco-élastique dont les propriétés élastiques génèrent une onde de pression incidente provenant du cœur. Les ondes sont réfléchies au niveau des bifurcations périphériques des artères de conduction et des artères musculaires plus petites, à haut niveau de résistance. La géométrie, le nombre des artéioles et l'architecture du réseau de micro vascularisation jouent un rôle important dans la réflexion de l'onde incidente. La constriction artérielle et artériolaire conduit à des points de réflexion plus proches du cœur et à des ondes de réflexion aortique plus précoces, avec un effet délétère sur la vascularisation coronaire et le masse ventriculaire gauche.

- Le système nerveux végétatif ou autonome (SNA, car échappant au contrôle volontaire) régule les fonctions organiques internes, dont la régulation du système cardio-vasculaire, dont les rythmes circadiens de la pression artérielle (PA) et de la fréquence cardiaque (FC). Par ailleurs, il exerce un rôle important dans les situations quotidiennes que sont l'orthostatisme, l'exercice physique, le choc thermique ou émotionnel. L'atteinte du SNA cardiaque est responsable d'une morbi-mortalité cardio-vasculaire augmentée. Le diabète s'associe à une forte prévalence d'atteinte du SNA, avec notamment une atteinte autonome cardiaque responsable d'un déséquilibre de la balance vago-sympathique en faveur de l'activité sympathique.

Il apparaît intéressant d'évaluer les modifications des intégrateurs de risque avec une approche systématique chez des sujets qui représentent le continuum glycémique de la normoglycémie jusqu'à la découverte du diabète, après un petit déjeuner standardisé, car cette période postprandiale intègre les réponses hémodynamiques, les signaux des substrats énergétiques et hormonaux ainsi que la réponse du SNA.

La contribution de la glycémie à jeûne/postprandiale et l'exposition hyperglycémique chez des sujets en surpoids ou obèses sans dysglycémie connue n'ont pas été étudiées à ce jour.

Un bon exemple de la complexité de la réponse post prandiale est illustré par l'effet d'une action quotidienne simple et essentielle comme boire de l'eau sur la régulation

cardiovasculaire autonome. L'ingestion d'environ un demi-litre d'eau augmente le tonus sympathique et provoque une vasoconstriction. Chez des sujets jeunes en bonne santé, l'activation sympathique après avoir bu de l'eau provoque peu ou pas de changement de la PA tant que chez les personnes âgées on obtient une réponse hypertensive modérée de 11 mmHg. La même réponse est accompagnée par une activation vagale cardiaque chez les jeunes sujets sains. Cette réponse diffère donc selon l'âge, selon le niveau de mesure de l'activité autonome (cardiaque vs musculaire) et peut être liée à la distension gastrique et ou aux propriétés hypoosmotiques de l'eau.

Dans un premier temps, nous avons étudié une population de patients obèses couvrant le continuum glycémique de la normoglycémie jusqu'à la découverte du diabète, sans dysglycémie connue. L'utilisation des holters glycémiques nous a permis d'estimer la contribution des repas sur l'Hémoglobine glycosylée (HbA1c). Nous avons parallèlement fait une deuxième étude de mise au point dans laquelle nous avons comparé la cinétique d'un petit déjeuner qui ressemble aux habitudes alimentaires françaises par rapport à une charge orale en glucose.

Ensuite nous avons étudié l'impact du statut alimentaire dans une population de patients sans facteur de risque cardiovasculaire et sans dysglycémie connue issus de la cohorte SUVIMAX2 dans une étude cas-témoins de type «exposé/non exposé» (étude NUTRIVASC). Le rôle de l'alimentation sur les intégrateurs de risque cardiovasculaire reste insuffisamment connu, ainsi que leurs modifications concomitantes après un repas. La prévention des événements cardiovasculaires passe par des programmes à échelle nationale, comme le Programme National Nutrition Santé (PNNS). Ce travail avait comme objectif de montrer aussi l'intérêt de l'alimentation recommandée par le PNNS sur le risque cardiovasculaire.

La troisième partie concerne des diabétiques de type 2 qui présentaient un ou plusieurs facteurs de risque. Nous avons étudié l'influence respective du contrôle glycémique à jeun et post-prandial à moyen terme sur des intégrateurs du risque cardiovasculaire. Dans cette étude pilote, nous avons évalué les mêmes paramètres avant et après l'introduction de trois schémas d'insulinothérapie différents (étude INSUVASC).

La comparaison des sujets de l'étude NUTRIVASC et des diabétiques de type 2 de l'étude INSUVASC nous permet de mieux étudier les intégrateurs de risque, le vieillissement vasculaire et la réponse hémodynamique post prandiale.

Dans la dernière partie, nous avons étudié chez les patients diabétiques de type 2 des facteurs non classiques de rigidité artérielle. L'augmentation de la rigidité vasculaire est l'équivalent du vieillissement vasculaire et intègre l'effet des facteurs de risque cardiovasculaire dit classiques comme le diabète, le tabac et l'âge. Nous avons évalué les relations entre rigidité artérielle et neuropathie diabétique et élasticité hépatique après exclusion des facteurs de confusion tels que l'âge et l'HTA.

# **Deuxième partie**

## **2 Synthèse de la littérature.**

## **2.1 Endothelium.**

### **2.1.1 Physiologie.**

L'endothélium est à tort souvent considéré comme le matériel de revêtement des artères, les cellules endothéliales (CE) sont en réalité des acteurs clés dans les maladies vasculaires.

L'endothélium est un des plus importants organes du corps et également probablement l'un des plus hétérogène.

L'endothélium comprend une grande collection de différents sous-types de CE suivant leur phénotype, leur fonction et leur emplacement. Les différents types de CE peuvent s'adapter à des flux métaboliques spécifiques pour chaque tissu selon les substrats qui sont disponibles. Les CE microvasculaires au niveau artériel, veineux, et lymphatique ont chacune des fonctions différentes et sont confrontées à des concentrations d'oxygène différentes et ceci explique probablement les différences de leur métabolisme basal. Par exemple, les CE de la microcirculation vasculaire pulmonaire diffèrent par rapport aux CE pulmonaires artérielles sur la consommation d'oxygène et en ATP total intracellulaire. En outre, les CE microvasculaires cérébrales ont significativement plus de mitochondries que les CE dans les autres tissus [8].

La découverte du NO comme une molécule cruciale sécrétée par l'endothélium et destinée à promouvoir la relaxation vasculaire représente une avancée majeure dans la conception du rôle de l'endothélium vaso moteur. La dysfonction endothéliale vasculaire est un état pathologique caractérisé principalement par un déséquilibre entre les substances vasodilatatrices, antimitogènes et antithrombotiques (facteurs de vasorelaxation dérivés de l'endothélium) versus de substances avec des propriétés de vasoconstriction, prothrombotiques et prolifératives. Parmi les molécules vasodilatatrices les plus importantes, en particulier au niveau des artères musculaires, on retrouve le NO, qui inhibe également des événements clés dans le développement de l'athérosclérose: adhérence et agrégation plaquettaire, adhésion leucocytaire, migration et prolifération des cellules musculaires. En ce qui concerne la microcirculation, la prostacycline et d'autres facteurs d'hyperpolarisation endothéliale jouent un rôle important.

Généralement, la perte de la biodisponibilité du NO indique un phénotype dysfonctionnel sur de nombreuses propriétés de l'endothélium. Ainsi, l'évaluation des propriétés vasodilatatrices résultant du NO et d'autres molécules peut fournir des informations sur l'intégrité et la fonction de l'endothélium. Fait intéressant, la plupart, sinon la totalité des facteurs de risque cardiovasculaire sont associés à un dysfonctionnement endothélial [9].

### **2.1.1.1 Voies métaboliques des cellules endothéliales**

La génération d'ATP par la phosphorylation oxydative dans les CE devrait être la voie préférée à cause de son rendement énergétique et de la présence d'une exposition immédiate à l'oxygène du flux sanguin. Cependant, les CE ont un relativement faible nombre des mitochondries et leur métabolisme repose principalement sur la glycolyse. Les taux de glycolyse in vitro sont comparables ou même plus élevés dans les lignées des cellules cancéreuses [10, 11].

Les principales voies métaboliques au niveau de l'endothélium sont celle du glucose, des acides gras (AG) et des acides aminés (AA). La plupart des résultats sont obtenus à partir des expériences in vitro.

#### **2.1.1.1.1 *Glucose***

La glycolyse aérobie est la voie métabolique principale dans les CE, ce qui présente certains avantages comme (1) la diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), (2) la préservation des taux d'oxygène disponibles pour les cellules périvasculaires, (3) l'adaptation des CE aux environnements hypoxiques et (4) la production de lactate souvent utilisée comme une molécule pro-angiogénique [12].

La phosphorylation oxydative (oxPPP) génère du NADPH qui peut être utilisé comme rédox dans la synthèse des lipides et dans le processus de la restauration de la capacité antioxydante de glutathion par conversion de la forme oxydée à la forme réduite [13].

Le glucose peut également être dévié vers d'autres voies liées à la glycolyse, comme la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) et de la voie du pentose phosphate (PPP). Les HBP utilisent le glucose, la glutamine, l'acétyl-CoA et l'uridine pour générer de la N-acétylglucosamine pour la O- et N- glycosylation des protéines [14].

Le glucose peut entrer dans la PPP dans sa forme glucose-6-phosphate. Il alimente la production de nucléotides avec son squelette d'un sucre à 5 atomes de carbone (pentose) et réduit la migration et la viabilité des CE [15].

#### **2.1.1.1.2 *Acides gras***

Les AG représentent une autre source d'énergie pour les CE dans des conditions de privation du glucose in vitro. Par exemple, les CE peuvent augmenter leur flux des AG avec l'activation de l'AMPK.

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) augmente l'expression de la protéine FABP4 et l'entrée intracellulaire des AG, le rôle exact de l'oxydation des AG est incertain à l'heure actuelle vu que leur contribution sur l'ATP total est minime [16]. Les AG nécessaires sont fournis à l'intérieur de la lumière capillaire par l'hydrolyse des lipoprotéines riches en triglycérides par la lipoprotéine lipase.

#### **2.1.1.1.3     *Acides aminés***

Le métabolisme des AA est moins étudié. Le métabolisme de l'arginine est le mieux étudié parmi les AA pour sa conversion en citrulline et du NO, par le synthase endothéliale du NOS (eNOS). La sérine présente un intérêt particulier ici parce que sa synthèse l'interconnexion fonctionnelle entre le métabolisme du glucose et glutaminique. La sérine semble affecter surtout la PA en favorisant la vasodilatation par l'activation des canaux KCa qui sont présents dans l'endothélium [17].

#### **2.1.1.1.4     *AMPK et détection d'énergie intracellulaire***

Les voies métaboliques décrites sont contrôlées par la présence du substrat et du produit final, mais aussi par l'action des détecteurs d'énergie intracellulaire comme l'AMPK. La demande d'énergie non satisfaite est exprimée par l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate intracellulaire, ce qui active la protéine kinase activé par l'adénosine monophosphate (AMPK) afin d'augmenter le flux par des voies métaboliques de production d'énergie (par exemple, l'oxydase des acides gras) et maintenir le niveau d'énergie intracellulaire. Plus précisément dans les CE, l'AMPK peut également être activée par des stimuli comme l'hypoxie / ischémie et le stress mécanique provoqué par le flux sanguin.

#### **2.1.1.1.5     *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), angiogenèse et flux glycolytique***

La stimulation par le VEGF a comme résultat de doubler le flux glycolytique des CE afin de répondre à l'augmentation de la demande énergétique pour le remodelage du cytosquelette lors de la migration des CE.

Dans les CE, la fonctionnalité des protéines clés angiogéniques comme le Notch et le récepteur VEGF de type 2 dépend de leur glycosylation. Bien que son rôle in vivo soit moins bien caractérisé, l'HBP peut servir comme une voie de détection des nutriments afin de guider l'angiogenèse vers des régions riches sur des nutriments. L'inhibition de l' HBP réduit considérablement l'angiogenèse [18]

#### **2.1.1.1.6     *Diabète et produits de glycation avancée (AGE)***

L'enzyme glycolytique glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase est ADP-ribosylée par la polymérase de polyADP-ribose, ce qui a comme résultat le retard du flux glycolytique et l'accumulation des produits intermédiaires de la glycolyse, qui sont détournés ensuite dans d'autres voies pathologiques [12] :



- Le sorbitol, à son tour, est converti en fructose par l'action de la sorbitol déshydrogénase, ce qui conduit à la production de 3-désoxyglucosone et contribue à la génération non enzymatique des produits toxiques de glycation avancée (AGEs).
- La surcharge en fructose-6-phosphate augmente le flux vers le HBP, ce qui dans des conditions hyperglycémiques diminue l'angiogénèse.
- La glycéraldéhyde-3-phosphate et le phosphate de dihydroxyacétone sont dirigés vers la production de méthylglyoxal, ce qui contribue à la production de ROS et d'AGEs. En outre, la glycéraldéhyde-3-phosphate et le phosphate de dihydroxyacétone sont utilisés pour la synthèse de novo de diacylglycérol et l'activation de la protéine kinase C.
- Les AGEs peuvent former des lésions croisées sur des protéines (par exemple, sur la laminine, l'élastine et les collagènes) dans la matrice de la membrane basale extracellulaire. Cela contribue à l'augmentation de la rigidité artérielle et le vieillissement vasculaire. Les effets intracellulaires des AGEs circulants sont médiés par la liaison du récepteur avec les AGEs. Le récepteur est exprimé dans les monocytes, les cellules musculaires lisses et endothéliales.

### **2.1.1.2 Rôle de l'insuline et de l'insulino-résistance**

#### **2.1.1.2.1 *Transport transendothélial de l'insuline***

Le mécanisme du transport de l'insuline à travers l'endothélium n'est pas encore clairement défini. En effet, des résultats *in vivo* suggèrent que le transport de l'insuline à travers l'endothélium ne semble pas être saturable même à des concentrations pharmacologiques de l'insuline. Cela suggère qu'il ne s'agit pas d'un processus médié par le récepteur de l'insuline [19]. Ces données semblent indiquer qu'à des niveaux élevés d'insuline, le transport se produit par un processus indépendant de l'insuline transcellulaire ou paracellulaire. Un processus de transport paracellulaire serait moins probable étant donné la présence des interconnexions étroites (tight junctions) de l'endothélium musculaire [20].

#### **2.1.1.2.2 *Insulinorésistance et défaut de la signalisation insulinique : effet sur le recrutement capillaire.***

L'absorption initiale de l'insuline est probablement médiée par le récepteur de l'insuline parce que l'inhibition de plusieurs voies de signalisation de l'insuline inhibe ce processus. Des études indiquent qu'il existe une colocalisation de l'insuline avec le récepteur de l'insuline et la cavéoline-1, une protéine impliquée dans la formation de cavéoles. Les cavéoles et leur formation peuvent jouer un rôle très important dans le transport de l'insuline.

Dans les conditions de jeûne, les niveaux d'insuline sont faibles et les niveaux d'expression d'Insulin receptor substrate 2 (IRS-2, un messenger intracellulaire qui s'active après la liaison de l'insuline avec son récepteur) dans les cellules endothéliales sont maintenus élevés.

Après le repas, les activations de la protéine kinase B (Akt) et eNOS médiées par insuline sont induites de manière optimale, ce qui entraîne le recrutement capillaire, l'augmentation de la concentration interstitielle d'insuline, et l'absorption du glucose par le muscle squelettique. En revanche, l'hyperinsulinémie à jeun régule de façon négative l'expression IRS- 2 dans les cellules endothéliales et les activations d'Akt et de l'eNOS médiées par l'insuline en post prandial sont insuffisantes. Ceci a comme conséquence la diminution du recrutement capillaire induit par l'insuline, la diminution de la concentration d'insuline interstitielles et la diminution de l'absorption du glucose par le muscle [21].

Il a été suggéré que la dysfonction endothéliale aggravait également l'élimination du glucose, principalement en raison de la perte des propriétés vasoactives médiées par l'insuline (i.e. régulation de la perfusion capillaire dans les tissus sensibles à l'insuline) [22, 23].

### **2.1.1.3 Diabète et voies métaboliques impliquées dans la dysfonction des cellules endothéliales**

#### **2.1.1.3.1 *Diabète et espèces d'oxygène réactif (ROS)***

Chez les patients diabétiques, l'hyperglycémie réduit l'entrée du glucose dans la voie de la pentose phosphate, qui est médiée par l'action de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Cela réduit la production de NADPH (la molécule principale de la réduction intracellulaire) et augmente le stress oxydatif [15]. De ce fait, l'activation de la NADPH oxydase induite par le glucose génère des ROS. L'excès de glucose peut être transféré dans la voie des polyols, ce qui appauvrit encore les taux intracellulaires de NADPH et augmente les ROS.

L'excès de glucose induit l'activité de l'arginase, elle-même précurseur du NO. Cela découple l'activité de l'eNOS endothéliale (eNOS) et, à sa place, des anions superoxydes sont produits. Les ROS avec les espèces réactives de l'azote provoquent des cassures de brins d'ADN, qui activent l'enzyme polymérase poly ADP-ribose.

L'hyperglycémie provoque la mitochondriopathie endothéliale avec des défauts dans la biogénèse mitochondriale et la mitophagie (ce qui cause l'accumulation intracellulaire des mitochondries endommagées), la fragmentation mitochondriale et une altération de leur fonctionnalité et augmentation de la production ROS.

### 2.1.1.3.2 Diabète, signalisation insulinique et effet protecteur ou délétère de l'insulinothérapie

Dans le cas du diabète mal contrôlé, l'excès de glucose et des AG circulants est associé à une insulino-résistance qui inhibe la signalisation insulinique dans les cellules endothéliales par l'intermédiaire de la 3-phosphoinositide kinase (PI3K). Il s'agit de la voie qui produit le NO, et inhibe les facteurs anti-thrombotiques comme les molécules d'adhésion, la prolifération des cellules musculaires lisses et provoque la vasodilatation.

En parallèle, la même situation active la voie de la kinase activée par des agents mitogènes (MAPK) qui reste sans opposition par la voie des PI3K et provoque une augmentation de la production d'Endothelin -1 ainsi qu'un effet de vasoconstriction médié par l'insuline. Quand il existe un déséquilibre entre les deux voies, il existe un dysfonctionnement endothéliale.

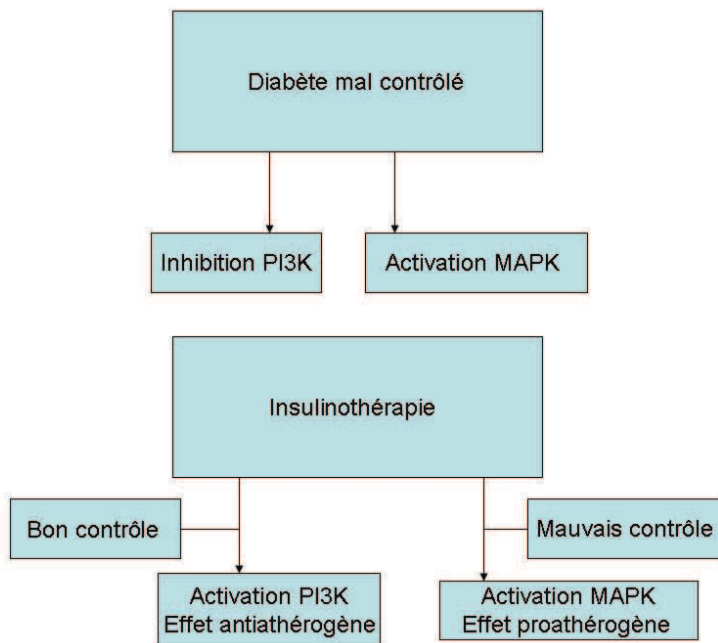


Figure 1: Diabète, signalisation insulinique et effet de l'insulinothérapie.

D'après [24].

Ainsi, un traitement par l'insuline exogène devrait conduire à une diminution des taux de nutriments circulants et une augmentation de la voie PI3K de telle sorte que l'insulinothérapie sera bénéfique pour les vaisseaux. Cependant, si l'insulinothérapie ne parvient pas à contrôler le diabète on aura toujours une insulino-résistance car la voie PI3K restera inhibée et la signalisation insulinique prédominante est celle de la voie de MAPK. L'effet serait nocif avec une augmentation du risque d'événements cardiovasculaires [24].



## **2.1.2 Techniques d'exploration de la fonction endothéliale**

### **2.1.2.1 Principe général**

La dysfonction endothéliale des artères coronaires athérosclérotiques a été démontré pour la première fois par perfusion intra coronaire d'acétylcholine (Ach) avec évaluation coronarographique quantitative en 1986 [25]. Ludmer et al. ont changé la compréhension de l'athérosclérose humaine, qui jusqu'alors avait été considérée comme une maladie purement structurelle. Leur recherche a attiré l'attention sur les manifestations fonctionnelles de l'athérosclérose comme la vasoconstriction exagérée observée en cas de dysfonction endothéliale.

Le principe de base des explorations est le suivant: les artères en bonne santé, comme les artères coronaires ou brachiales, vont se dilater en réponse à une hyperémie réactive (vasodilatation médiée par le flux) ou après des stimuli pharmacologiques. Ces produits vasodilatateurs tels que l'Ach, la bradykinine ou la sérotonine agissent par l'intermédiaire de libération de NO et/ou d'autres substances vasoactives. Dans les états pathologiques, la dilatation endothélium-dépendante est réduite ou absente. Cependant, quelle que soit la technique appliquée, les réponses vasculaires sont déterminées non seulement par l'état fonctionnel du système vasculaire à l'endroit de la mesure, mais aussi par l'état structurel des artères de résistance dans le système microvasculaire.

### **2.1.2.2 Perfusion de substances vaso-actives**

On peut différencier les réponses vasculaires endothélium-indépendantes des réponses endothélium-dépendantes. Les donneurs de NO exogène (comme le glycerol-trinitrate) ou donneurs non NO comme l'adénosine vont induire une vasodilatation en agissant directement sur les cellules musculaires lisses. La fonction endothélium-indépendante est associée à des altérations vasculaires structurelles et des modifications dans les cellules des muscles lisses plutôt que des modifications de l'endothélium.

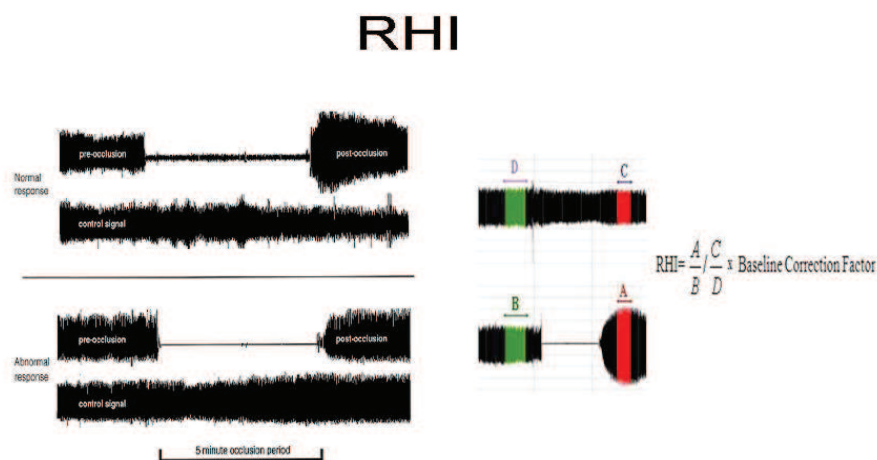
### **2.1.2.3 Dilatation médiée par le flux**

La vasodilatation des artères de bras médiée par le flux est devenue la technique la plus largement utilisée pour mesurer la fonction endothéliale. Cette technique mesure la capacité des artères à réagir après une occlusion de l'artère humérale. Celermajer et al. [26] ont été les

premiers à mesurer cette réponse in vivo en mesurant les changements de diamètre artérielle par ultrasons. Cette réponse est principalement NO dépendante, [27, 28] bien que d'autres voies de vasodilatateurs peuvent également y contribuer [29]. Fait important, la fonction endothéliale périphérique évaluée par la vasodilatation médiée par le flux est corrélée avec la fonction endothéliale coronaire [30]. Cependant, bien que le principe de cette technique semble simple, son application est techniquement difficile et nécessite un opérateur expérimenté.

### 2.1.2.3.1 *EndoPAT*

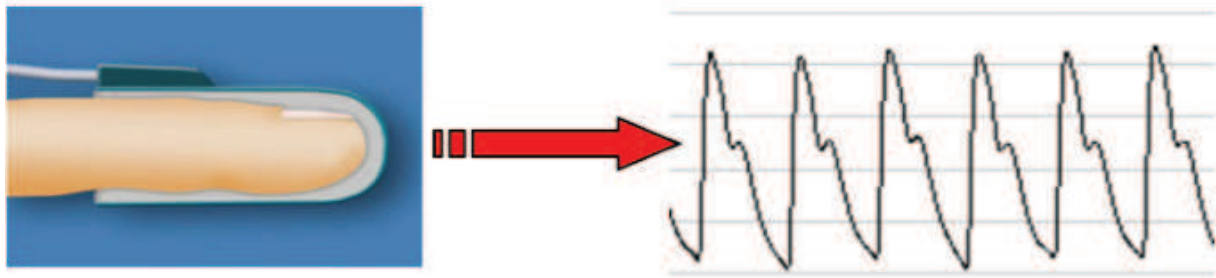
L'appareil EndoPAT (PAT: Peripheral Arterial Tone) est basé sur une technologie non invasive destinée à la mesure du tonus artériel périphérique. La technique est opérateur indépendante, facile à utiliser et à faible risque pour le patient. C'est pourquoi nous l'avons choisi pour mesurer la fonction endothéliale dans les études que nous avons menées dans le cadre de cette thèse. Il mesure les changements médiés par l'endothélium sur le tonus vasculaire à l'aide de capteurs placés sur la pulpe des doigts. Ces changements de tonus artériel sont provoqués par la création d'une réponse hyperémique en aval d'une occlusion transitoire. On occlut avec une pression à 60 mmHg au-dessus de la pression systolique, avec un minimum de 200 mmHg, pendant 5 min sur l'artère branchiale en utilisant un simple brassard de pression. Lorsque le brassard est dégonflé, le flux sanguin provoque une dilatation artérielle endothélium-dépendante (FMD). La dilatation est captée par l'EndoPAT comme une augmentation de l'amplitude du signal PAT. Le ratio post / pré-occlusion est calculé de façon automatique par le logiciel EndoPAT et qui se manifeste en tant que hyperémie réactive et est exprimée comme un index (RHI : Reactive Hyperemia Index).



**Figure 2: Enregistrements EndoPAT**

*Les données après l'acquisition sont automatiquement traitées, analysées et présentées.*

Les mesures au niveau du bras opposé sont utilisées comme contrôle des changements non-endothélium dépendants du tonus vasculaire. Le test se fait sur une durée de 15 minutes. Il est très facile à réaliser, et est à la fois opérateur et observateur indépendant.



**Figure 3: Capteurs EndoPAT.**

Le signal de PAT est mesuré à partir des variations de volume artériel pulsatile aux bouts des doigts. Le système EndoPAT contient un appareil de mesure qui est lié à une paire de bio-capteurs pléthysmographiques modifiés. La caractéristique unique des bio-capteurs PAT est qu'ils mesurent la PA de façon uniforme aux deux tiers distaux des doigts. L'application de la pression de cette manière est extrêmement importante, car elle empêche la congestion veineuse distale, ce qui pourrait induire une vasoconstriction réflexe, et génère un signal PAT plus ample. Enfin, la fixation du système PAT réduit les artéfacts de mouvement.

#### **2.1.2.3.2 Comparaison des différents tests**

Le choix d'un test capable de mesurer la fonction endothéliale est toujours difficile car il doit réunir plusieurs éléments. Le premier élément est de refléter l'état de la maladie artérielle (si possible coronaire), d'être non invasive et d'avoir un risque proche de zéro pour le patient. Il doit également être opérateur indépendant, reproductible, facile à utiliser, réversible, peu coûteux et améliorer la stratification du risque.

Le Tableau 1: résume la comparaison des ces critères pour les tests les plus souvent utilisés.

	Infusion des substances vasodilatatrices		Hyperhémie réactive	
	Coronaires	Artères périphériques	Dilatation médiée par le flux (FMD)	EndoPAT
Non-invasive	-	-	+	+
Prédictive d'événements CV	++	++	++	+
Réversible	+	+	+	+
Utilisation d'une artère de contrôle	+	+	-	++
Coût	-	+	+	+/-
Faible risque	+/-	+	++	++
Opérateur indépendant	+/-	+/-	-	++
Facile à utiliser	-	-	-	+

CV: cardiovasculaires

**Tableau 1: Techniques utilisées pour la fonction endothéliale.**

*D'après [9]*

### 2.1.3 Biomarqueurs

Le recrutement des cellules inflammatoires circulantes et leur migration transendothéliale commencent tôt au cours de l'athérosclérose. Ce processus est principalement médié par des molécules d'adhésion cellulaire, qui sont exprimées sur la surface de l'endothélium vasculaire et dans les leucocytes circulants en réponse à plusieurs stimuli qui sont principalement inflammatoires. Les sélectines (P, E et L) et leurs ligands (principalement le ligand de la sélectine-P) sont impliqués dans la fonction d'accrochage de leucocytes sur la paroi vasculaire. Les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAMs) et les molécules d'adhésion vasculaire (VCAM-1), ainsi que certaines des intégrines, induisent une adhésion ferme de cellules inflammatoires à la surface vasculaire. Les molécules d'adhésion cellulaire endothéliales plaquettaires (PECAM-1) sont impliquées dans l'extravasation et la migration aux tissus sous-jacents. Pour la plupart des molécules d'adhésion cellulaire, à l'exception des intégrines, des formes solubles ont été identifiées dans la circulation. Plusieurs sources de données soutiennent un rôle crucial de molécules d'adhésion dans le développement de l'athérosclérose et de la plaque instable. VCAM-1, ICAM-1 et L-sélectine sont exprimées dans les plaques d'athérosclérose. On dispose déjà des données prospectives montrant le rôle prédictif d'événements cardiovasculaires des taux circulants élevés de sICAM-1 chez les sujets sains, et de sVCAM-1 chez les patients à risque élevé ou avec une maladie coronaire [31].



## **2.1.4 Déterminants**

Les composants du syndrome métabolique [32], comme le diabète [33], une PA élevée [34-36], la dyslipidémie [26, 34, 36, 37] et l'obésité [34] sont corrélés à la dysfonction endothéliale coronaire. Les autres déterminants de la fonction endothéliale sont l'âge, le sexe [38], le tabagisme [26, 34, 39, 40], l'équilibre glycémique chez le diabétique de type 2 [34], et les traitements anti-hypertenseurs [41] et hypo-lipémiants [34, 42].

Les patients présentant une hyperhomocystéinémie,[43, 44] les individus ayant de faibles taux de magnésium intracellulaire [45] et les patients atteints d'affections inflammatoires ou infectieuses [46, 47] ont une dysfonction endothéliale. Les facteurs de risque cardiovasculaire commencent à exercer leurs effets sur l'endothélium de façon très précoce dès l'âge de 8 ans [48].

Ce processus commence plusieurs années avant la manifestation clinique du diabète. L'état prédiabétique est accompagné par une inflammation et des lésions endothéliales [22, 49-51].

Les patients atteints de DT2 ont une fonction endothéliale altérée et avec une augmentation concomitante des marqueurs de l'activation endothéliale. Le traitement par des analogues de l'insuline de longue durée diminue le taux des molécules d'adhésion [52].

## **2.1.5 Pronostic**

### **2.1.5.1 Informations pronostiques en plus des scores de risque couramment utilisés en prévention primaire.**

La dysfonction endothéliale coronaire et périphérique est un facteur de risque fort et indépendant d'événements cardio-vasculaires [35, 53, 54]. Aussi une dysfonction endothéliale peut elle aussi être considérée comme un intégrateur vasculaire des conséquences de l'exposition aux facteurs de risque cardio-vasculaire chez le diabétique.

Malgré la présence des données montrant que la fonction endothéliale est prédictive de la survenue de futurs événements cardiovasculaires, même après un ajustement pour les facteurs de risque cardiovasculaire existants, son utilisation n'est pas encore préconisée dans les recommandations de prévention édictées par la Société Européenne de Cardiologie [55] ni dans celles publiées plus récemment par l'American Heart Association et l'American College of Cardiology [56] et pour l'instant elle est considérée comme inférieure (indication de classe

III) à celle des évaluations de l'épaisseur de l'intima media carotidienne et du score calcique coronaire. Les raisons qui ont conduit à attribuer cette indication de classe III ont été selon les experts l'absence de valeur pronostique supplémentaire clairement établie et la standardisation médiocre des méthodes d'exploration non invasives (à l'exception de l'EndoPAT).

#### **2.1.5.2 Intérêt pronostique dans la prévention secondaire.**

Compte tenu du rôle important que joue la dysfonction endothéliale dans la pathogenèse de la maladie athérothrombotique, il n'est pas surprenant que de nombreuses études aient mis en évidence l'intérêt pronostique potentiel de la fonction endothéliale en prévention secondaire, tant au niveau coronaire que périphérique. Les premières données en ce sens ont été recueillies chez des patients atteints de coronaropathies non occlusives, montrant que les taux d'événements cardiovasculaires et vasculaires cérébraux étaient significativement plus élevés parmi ceux dont la fonction endothéliale coronaire restait altérée [57].

#### **2.1.5.3 Réponse au traitement**

Il est extrêmement important de pouvoir dépister les patients chez lesquels des événements sont susceptibles de se produire malgré le traitement (afin d'éventuellement intensifier celui-ci). Une approche pourrait consister à évaluer l'impact de la thérapeutique sur la fonction endothéliale, en tant que témoin de l'atteinte cardiovasculaire, et d'intervenir plus intensivement sur les patients dont la fonction vasculaire n'a pas été améliorée. Dans une étude japonaise menée chez des patients ayant une maladie coronaire stable nouvellement diagnostiquée associée à une dysfonction endothéliale, la mesure de la dysfonction endothéliale a été répétée après 6 mois d'un traitement optimisé sur une base individuelle. Les patients chez lesquels la fonction endothéliale était altérée ont présenté, au cours du suivi, des taux d'événements plus élevés (26 %) sur 31 mois par rapport à ceux qui présentaient une fonction endothéliale améliorée (10 %) [58]. Dans une étude similaire menée chez 400 femmes ménopausées, hypertendues mais indemnes de coronaropathie, la fonction endothéliale a été évaluée à l'entrée dans l'étude puis 6 mois après avoir ramené la PA de ces patientes à une valeur normale. Chez les femmes dont la fonction endothéliale ne s'était pas améliorée (37,5 %), le taux d'événements cardiovasculaires a été près de 7 fois supérieur au terme d'une période moyenne de suivi de 67 mois [59]. Ces deux études apportent la démonstration de la valeur prédictive de la fonction endothéliale sur la réponse au traitement. Les patients chez lesquels les interventions thérapeutiques n'induisent pas d'amélioration de

la fonction endothéliale encourent un risque majeur d'événements pathologiques. D'autres études seront nécessaires pour parfaitement éclairer l'un des aspects les plus insolites de l'exploration de la fonction endothéliale [60].

### **2.1.6 La fonction endothéliale microvasculaire et macrovasculaire sont-elles comparables?**

Les facteurs de risque cardiovasculaire sont associés à la dysfonction endothéliale et ont un impact pratiquement sur tous les réseaux vasculaires. Le rôle physiologique des grandes artères et des artères de résistance est très différent. La réduction de la libération de NO joue un rôle central dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale dans les grandes artères. D'autre part, le NO dans la microcirculation a comme objectif principal de moduler le métabolisme tissulaire [61]. Les facteurs métaboliques sont probablement plus importants dans la régulation de la fonction microvasculaire [62]. Par conséquent, des tests pharmacologiques induisant la libération de NO au niveau des grosses artères ne pourraient pas refléter l'adaptation physiologique de la fonction endothéliale microvasculaire.

La dissociation de l'effet nocif du tabagisme chez les jeunes fumeurs ayant une coronaropathie et qui présentent une dysfonction endothéliale coronaire mais une fonction endothéliale microvasculaire conservée, malgré l'augmentation des taux de biomarqueurs inflammatoires et du stress oxydatif, représente un tel exemple [63]. En outre, le flux sanguin post ischémique est particulièrement sensible aux facteurs de risque traditionnels (par exemple, l'âge et l'hypertension), tandis que la tonométrie artérielle périphérique (indice d'hyperémie réactive de microvascularisation) est plus sensible aux facteurs de risque métaboliques, en particulier indice de masse corporelle (IMC) et le diabète.

Dysfonctionnement microvasculaire et macrovasculaire pourraient refléter les différents stades de la maladie vasculaire, le dysfonctionnement microvasculaire étant un indicateur précoce du risque. Le fait que la fonction microvasculaire endothéliale et la fonction endothéliale macrovasculaire ne montrent qu'une faible corrélation [64] devrait mettre en garde contre l'extrapolation des résultats sur la macrovascularisation et qui provient des études de microvascularisation et vice versa. Étant donné que l'endothélium microvasculaire et macrovasculaire sont sensibles à des différents facteurs de risque, les deux doivent être évalués chaque fois.

## 2.1.7 Résumé

- ❖ Il existe une pléiade de phénotypes et de fonctions des cellules endothéliales, selon leur spécificité tissulaire les cellules endothéliales utilisent une voie métabolique principale, la glycolyse. La glycolyse génère de l'ATP pour ces besoins énergétiques, mais participe aussi par l'intermédiaire du VEGF sur le remodelage du cytosquelette lors de la migration des CE. Dans les situations physiologiques l'abondance du glucose augmente l'angiogenèse mais aussi la sécrétion de VEGF peut doubler le flux glycolytique.
- ❖ L'hyperglycémie provoquée par le diabète augmente la production ROS et des AGEs ce qui contribue à l'augmentation de la rigidité artérielle et le vieillissement vasculaire.
- ❖ Le principe de base des explorations artérielles de la fonction endothéliale dépend soit sur la capacité des artères à réagir après une occlusion (réponse NO dépendante) ou après des stimuli pharmacologiques.
- ❖ L'utilisation de l'appareil EndoPAT nous fournit des mesures qui sont opérateur indépendants, rapides (15 minutes), faciles à utiliser (ne nécessite pas une formation spécifique) et à faible risque pour le patient.
- ❖ Dans la littérature, on voit le plus souvent des mesures ponctuelles de la fonction endothéliale microvasculaire ou macrovasculaire. Dans cette thèse, nous avons effectué des mesures micro (avec des mesures du flux sanguin cutané, cf le prochain chapitre) et macrovasculaires de la fonction endothéliale ainsi que des biomarqueurs à jeun et en post prandial.
- ❖ A notre connaissance, il existe très peu des données sur la fonction endothéliale en période post prandiale dans des conditions standardisées qui ressemblent la vraie vie. Le traitement par insuline après metformine et l'impact des effets du PNNS ne sont pas encore étudiés.
- ❖ Le traitement par l'insuline peut protéger l'endothélium par la diminution de la production de ROS et des AGEs et surtout par l'activation de la voie de la PI3K. Cependant, si l'insulinothérapie ne parvient pas à contrôler le diabète, la voie prédominante est celle de la voie de MAPK avec des effets plutôt nocifs. L'insuline entraîne également au niveau tissulaire le recrutement capillaire et facilite l'absorption du glucose par les tissus.

## **2.2 La microcirculation cutanée**

### **2.2.1 Physiologie.**

#### **2.2.1.1 Anatomie vasculaire**

La microcirculation cutanée est organisée en deux réseaux horizontaux. Le premier est situé à  $\pm 1,5$  mm de la surface de la peau et le deuxième est à la jonction du derme et du tissu sous cutané. Les artérioles et les veinules forment les 2 réseaux parallèles. Venants du réseau supérieur, les capillaires artériels montent afin de former des boucles papillaires dermiques alimentant la région cutanée. A la jonction dermique sous-cutanée, les veines contenant des valves anti reflux collectent le sang.

#### **2.2.1.2 Tonus vasoconstricteur cutané**

Le réflexe neuronal de la circulation de la peau humaine se fait par l'intermédiaire de deux branches du système nerveux sympathique. Il existe des nerfs sympathiques vasoconstricteurs noradrénergiques. Ils produisent une activité tonique une innervation tonique, contribuant à un flux sanguin de repos relativement faible en normothermie ( $\sim 250$  ml/min) [66]. Les enregistrements avec le doppler laser ont démontré la présence d'une motricité vasculaire localisée à la partie ascendante des artérioles [65].

Ainsi, au repos chez des sujets en environnement normothermique, l'interruption de l'innervation cutanée noradrénergique sympathique [par de méthodes diverses, y compris l'inhibition de la terminaison neuronale et/ou l'inhibition présynaptique avec du brétylium] provoque habituellement une vasodilatation passive minime par inhibition du tonus des nerfs vasoconstricteurs. Le degré de vasodilatation passive dans ce cas varie avec la température. Ainsi, dans des environnements chauds, il peut y avoir peu ou pas de vasodilatation passive lors de l'interruption de l'innervation vasoconstrictrice, alors que, dans des environnements plus froids, cette vasodilatation sera plus prononcée. Cela démontre l'importance de maintenir une température stable pendant l'expérimentation.

L'action vasoconstrictrice sympathique représente la «première ligne de défense» lors de l'exposition à des températures ambiantes froides. Ainsi, lorsque la peau est soumise à des températures froides (interne ou externe), l'activation réflexe des nerfs vasoconstricteurs sympathiques entraîne une vasoconstriction et une diminution de la circulation sanguine cutanée [67, 68]. Les mécanismes impliqués dans la vasoconstriction cutanée réflexe sont plus

complexes qu'on ne le pensait. En plus d'une vasoconstriction médiée par la noradrénaline [68], Stephens et al. ont identifié le rôle de co-transmetteurs noradrénergiques chez de sujets jeunes par inhibition pharmacologique combinée présynaptique et postsynaptique. L'existence de co-transmetteurs nécessaires pour la vasoconstriction a été démontrée pour le neuropeptide Y, l'ATP [69] et l'activation de la Rho kinase chez les sujets âgés [70].

### **2.2.1.3 Vasodilatation cutanée**

La double innervation sympathique de la peau (présence des nerfs vasoconstricteurs ainsi que des nerfs vasodilatateurs) a été démontrée la première fois dans les années 1930 [71]. Les nerfs sympathiques vasodilatateurs ne présentent pas d'activité tonique en normothermie, mais pendant une hyperthermie, ils sont responsables de la plupart (jusqu'à 90%) de la vasodilatation. Les mécanismes exacts de la vasodilatation cutanée humaine restent incomplètement compris.

La vasodilatation active et la transpiration sont les deux mécanismes importants de dissipation de la chaleur au cours de l'hyperthermie globale. Plusieurs chercheurs ont montré qu'en cas d'inhibition postsynaptique des récepteurs muscariniques par l'atropine, on obtient une abolition complète de la transpiration. Cela ne provoque qu'une diminution mineure et retardée de la vasodilatation cutanée [72].

L'inhibition intradermique directe des récepteurs de la bradykinine ne modifie pas les réponses de la circulation sanguine après un stimulus thermique [73]. L'implication de l'innervation cholinergique a été démontrée par Kellogg et al : l'administration locale de toxine botulinique abolit la vasodilatation cutanée active déclenchée par le réchauffement du corps. Par ailleurs, une réponse vasodilatatrice atténuée est produite sur les sites prétraités avec de l'atropine (blocage des récepteurs muscariniques post-synaptiques).

Ainsi l'inhibition présynaptique de la neurotransmission cholinergique, mais pas postsynaptique, par blocage pharmacologique des récepteurs muscariniques, bloque la vasodilatation cutanée active. Les auteurs concluent qu'un co-transmetteur cholinergique non identifié participerait au mécanisme de vasodilatateur [74].

Le NO a une importante contribution dans la vasodilatation cutanée active, avec une réponse très variable selon les individus [75]. Les données récentes de Kellogg et al. suggèrent que le NO est synthétisé principalement par la NO synthase (NOS) neuronale plutôt que la eNOS endothéliale. Cependant, l'inhibition de la synthèse de NO ne supprime pas la vasodilatation cutanée active, indiquant l'existence d'autres mécanismes de vasodilatateurs synergiques avec et/ou complétant la voie de la vasodilatation par NO [76].

Le peptide intestinal vasoactif (VIP) serait un autre candidat possible de la vasodilatation active cutanée. Il a été colocalisé dans les terminaisons nerveuses cholinergiques humaines

[77]. Cependant son rôle n'est pas clairement élucidé, et pour le moment d'autres équipes n'ont pas confirmé ces résultats [78]. La substance P, également localisée dans la peau humaine, représente une autre voie possible de la vasodilatation. Elle pourrait se lier avec une forte affinité aux récepteurs de la neurokinine-1 (NK-1) [79].

Cette liste doit être enrichie par d'autres neuromédiateurs à activité vasodilatatrice comme l'histamine (via l'activation des récepteurs H1) [80] ou les prostanoïdes [81]. Ainsi, une synthèse du travail de nombreux laboratoires sur plusieurs décennies montre un mécanisme complexe de contrôle de la circulation sanguine de la peau pendant le réchauffement du corps (réflexe). La vasodilatation par l'action du sympathique dans la peau humaine est un processus actif et le mécanisme implique l'action cholinergique et la présence d'autres co-transmetteurs. Plusieurs vasodilatateurs spécifiques semblent être impliqués dans le mécanisme, qui incluent des fonctions (ou des rôles potentiels) pour le NO, VIP, la substance P/récepteurs NK-1, l'histamine et les prostaglandines. Les implications de ces mécanismes multiples et les interactions entre eux représentent des domaines passionnants pour la recherche future [75].

## **2.2.2 Méthodes d'exploration**

Les fonctions de l'endothélium microvasculaire sont multiples et incluent le contrôle du tonus vasculaire, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la marginalisation des leucocytes, la régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses et la modulation de la perméabilité de la paroi vasculaire. Toutefois, l'expression «fonction endothéliale est utilisée dans la plupart des cas pour désigner l'aptitude de l'endothélium à libérer des substances qui peuvent induire une relaxation directe de la paroi vasculaire, comme le NO, les prostacyclines et les facteurs d'hyper polarisation (EDHFs).

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'étude de la fonction endothéliale, il s'agit de tests microvasculaires non invasifs avec ou sans intervention pharmacologique.

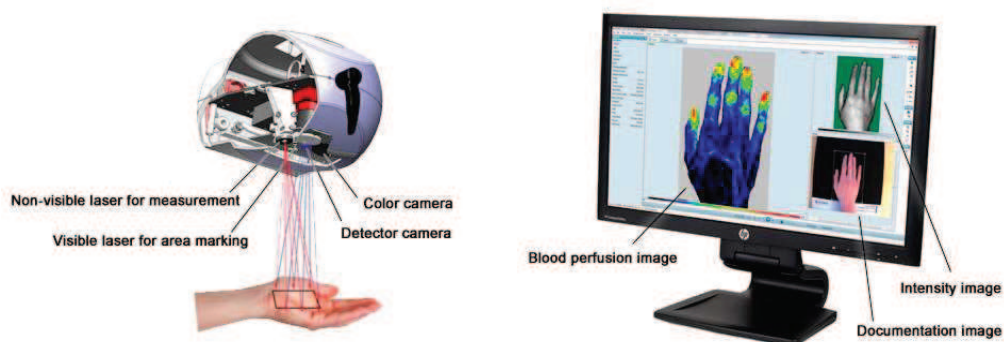
### **2.2.2.1 Etude de la fonction microvasculaire sous cutanée par laser doppler**

L'étude de la fonction microvasculaire peut être effectuée chez l'homme à l'aide du laser Doppler permettant la mesure du flux sanguin cutané. L'utilisation du laser Doppler pour l'étude de la fonction microvasculaire est basée sur la réflexion d'un faisceau de la lumière laser. La lumière subit des changements de longueur d'onde (phénomène Doppler) quand elle va heurter les cellules sanguines. L'amplitude et la fréquence de longueur d'onde de ces

changements sont liées à la vitesse et au nombre de cellules sanguines. Plusieurs signaux différents peuvent être enregistrés, mais le flux de globules rouges (c'est à dire le produit de la vitesse et de la concentration de cellules sanguines en mouvement dans le volume de mesure) est le plus souvent utilisé. L'avantage majeur de cette technique est sa sensibilité à détecter et quantifier les changements relatifs dans la circulation sanguine de la peau en réponse à un stimulus.

### 2.2.2.2 Imagerie de contraste utilisant la granularité laser (SPECKLE).

Une nouvelle technique d'imagerie permet d'étudier une surface cutanée plus importante par rapport au laser Doppler classique. Avec le phénomène de granularité, on peut obtenir une carte de la perfusion des tissus; les «tâches» d'intensité différente sont générées par la lumière rétrodiffusée et collectée par un détecteur (**Figure 4**). Quand un objet rugueux est éclairé par un faisceau laser, les mouvements des particules dans la région de l'éclairage produisent des fluctuations sur le motif de granularité apparaissant sur le détecteur. Une image de granularité est acquise avec une caméra (localisée à l'intérieur de la tête d'imageur) pendant un intervalle de temps appelé temps d'exposition [82].



**Figure 4:** *Imagerie de contraste utilisant la granularité laser.*

*Référence (<https://www.perimed-instruments.com/fr/laser-speckle-contrast-imagerie>)*

Tous les tests classiques réalisés avec le laser Doppler comme l'hyperémie réactive post-occlusive, la stimulation thermique et l'iontophorèse peuvent être utilisés avec cette nouvelle technique.

Il a été montré récemment que les résultats obtenus avec l'imagerie de contraste utilisant la granularité et le laser Doppler ont une excellente corrélation lorsque les données sont exprimées en unités de perfusion arbitraires sans soustraire le zéro biologique.



Une autre différence est que la profondeur de tissu mesurée avec la technique laser Doppler classique (en fonction de la longueur d'onde du laser) est supérieure que celle de l'imagerie de contraste avec la granularité laser. Le laser Doppler classique peut mesurer les vaisseaux à une profondeur de 1 mm, tandis que la profondeur explorée avec la nouvelle technique est de 300  $\mu\text{m}$  (pour une longueur d'onde du laser de 780 nm) [83]. Pour les 2 techniques, c'est à dire le laser Doppler classique et l'imagerie de contraste utilisant la granularité laser, la mesure de profondeur dépend finalement de la longueur d'onde du laser et des propriétés optiques des tissus. Ainsi, cette nouvelle technique montre une bonne résolution spatiale et temporelle et une excellente reproductibilité [82].

### **2.2.2.3 Méthodes de stimulation non pharmacologiques**

#### **2.2.2.3.1 Hyperémie post-ischémique**

Ce test mesure l'augmentation du flux sanguin cutané au-dessus du niveau basal après une occlusion artérielle. On observe par un pic initial de flux qui se produit quelques secondes après la levée de l'occlusion. Ce test est effectué en plaçant un brassard à la partie distale du bras sous une pression 50 mmHg au-dessus de la pression artérielle systolique (PAS). La période ischémique utilisée dure 3 ou 5 min mais elle varie entre 3, 4, 5, 10 et 15 min. Le choix de cette période reste arbitraire et il existe une corrélation linéaire entre la période d'ischémie et l'amplitude de la réponse [84].

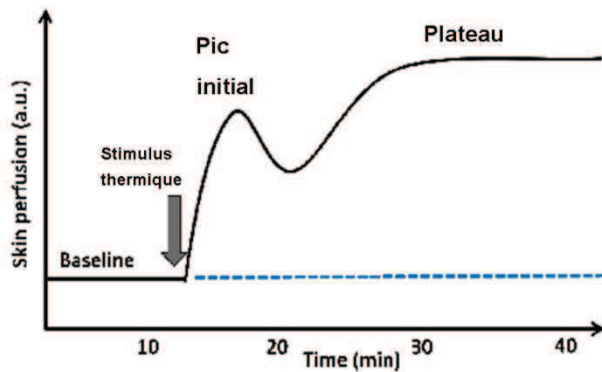
Les sondes Laser Doppler sont situées à la face interne de l'avant-bras, en évitant les régions avec pilosité. L'hyperémie post occlusive peut également être effectuée sur le membre inférieur et est bien adaptée pour les patients atteints de maladie artérielle périphérique occlusive [86].

Quatre facteurs principaux ont été proposés dans la réponse hyperémique : les facteurs métaboliques, endothéliaux, la réponse myogénique et l'action des nerfs sensoriels.

Parmi les vasodilatateurs endothéliaux, le NO a une action partielle [87, 88] avec implication des prostanoïdes [89]. Il n'y a pas de données concernant l'implication potentielle des EDHFs. La mesure de flux sanguin cutané sous hyperémie post ischémique peut être utilisée comme outil global détectant des changements de la fonction microvasculaire suite à une intervention pharmacologique (par exemple par statines) [89].

#### **2.2.2.3.2 Hyperémie thermique**

L'hyperémie thermique produit une vasodilatation maximale suite à une augmentation de la température entre 42.8 et 44.8 °C [90]. Cette vasodilatation thermique maximale correspond à la capacité maximale de vasodilatation avec 2 phases: un pic initial de la circulation sanguine cutanée pendant les 10 premières minutes, suivie par un plateau après 20-30 min d'échauffement.



**Figure 5: Hyperémie thermique.**

(perimed: <http://www.perimed-instruments.com/fr/produits/endothelial-dysfunction>)

La vasodilatation est médiée par au moins deux mécanismes indépendants : la phase initiale rapide s'appuie principalement sur les nerfs sensoriels locaux [91] et sur un réflexe axonal qui dépend de la sécrétion de CGRP (Calcitonin-gene-related peptide) et de la substance P [91] ; en revanche, le plateau de 20 à 30 min est médié principalement par le NO [92]. Les prostanoïdes ne semblent pas jouer de rôle [93]. L'hyperémie thermique est altérée dans le diabète [94, 95]. Bien que cette approche soit appropriée chez les témoins sains, on ne peut pas extrapoler à des populations de patients en raison d'une diminution potentielle de la réponse déjà provoquée par leur maladie. Les défauts de structure microvasculaire peuvent être détectés par le nitroprussiate de sodium (SNP). Seules les données indirectes telles que la réponse à l'administration de SNP sodium par iontophorèse fournissent la preuve que la diminution de la réponse au chauffage local est secondaire à une anomalie fonctionnelle plutôt qu'à un défaut structurel (par exemple la diminution de la densité capillaire).

### 2.2.2.3.3 Autres

L'hyperémie thermique et post-ischémique sont les tests microvasculaires non invasifs sans intervention pharmacologique le plus souvent utilisés. Le Tableau 2 récapitule les méthodes, le site d'action, les récepteurs et les mécanismes impliqués dans ces tests.

Test	Action endothéliale	Récepteurs	Effet	Mécanismes Possibles	Réf.
Test au froid	Endothélium indépendant	Récepteurs adrénergiques	VC	Norépinéphrine, rho-rho kinase, inhibition de NOS	[96-98]
Hyperémie locale thermique	Plutôt endothélium dépendant		VD	Réflexe Axonal (substance P et CGRP), sécrétion de la NO, participation de la norépinéphrine et du neuropeptide Y	[91, 92]
Hyperémie après occlusion	Endothélium dépendant et indépendant	...	VD	Nerfs sensoriels, facteurs métaboliques, Canaux BKCa	[99, 100]
VD induite par la pression	Endothélium dépendant et indépendant	Récepteur CGRP	VD	Fibres C, NO, prostaglandins, CGRP	[101, 102]
Réponse hyperémique transitoire	Endothélium indépendant	...	VD	Réponse myogénique	[103]

*NOS nitric oxide synthase; CGRP, calcitonin gene-related peptide; BKCa, large-conductance calcium-activated potassium. VD Vasodilatation VC Vasoconstriction*

**Tableau 2:** Tests microvasculaires non invasifs sans intervention pharmacologique. D'après [89].

## **2.2.2.4 Méthodes pharmacologiques**

### **2.2.2.4.1 Administration par iontophorèse de l'acétylcholine**

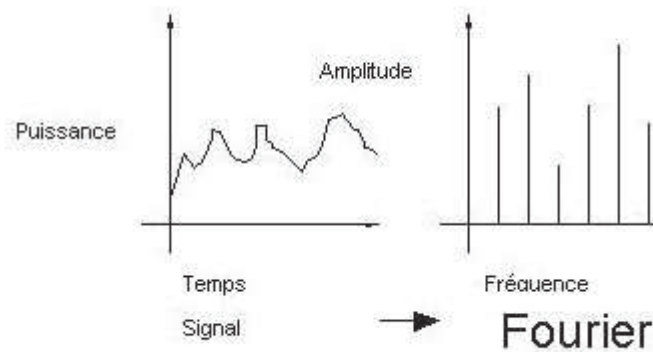
L'iontophorèse est basée sur le principe suivant : un médicament chargé en solution va migrer directement à travers la peau sous l'influence d'un courant électrique de faible intensité. La quantité de médicament administrée dépend de l'ampleur et de la durée du courant appliqué ainsi que de la barrière cutanée. Cette méthode permet de détecter des altérations du flux sanguin cutané suite à l'iontophorèse. Il y a une augmentation du flux qui présente un pic suivi d'une vasodilatation prolongée plus tardive. L'acétylcholine (Ach) et le SNP respectivement sont utilisés afin de générer une vasodilatation dépendante ou indépendante de l'endothélium. L'effet de l'activation du réflexe axonal induit par l'iontophorèse d'Ach peut être observé, mais il est dépendant des conditions expérimentales [85]. De plus, il s'agit d'un test très intéressant pour étudier la réactivité microvasculaire.

### **2.2.2.4.2 Administration de NO par microdialyse**

La microdialyse est une technique utilisée dans le but d'introduire ou d'enlever des ions, des molécules ou des médicaments d'intérêt dans l'espace interstitiel. Elle peut être utilisée pour administrer des agents pharmacologiques à une petite zone de tissu de telle sorte qu'il n'y ait pas de confusion avec des effets systémiques qui se produisent simultanément pendant l'échantillonnage du fluide effluent. En outre, la concentration des substances libérées en réponse à l'action pharmacologique peut être évaluée dans le dialysat. Les fibres de la microdialyse peuvent être insérées en intradermique et le flux peut être mesuré en utilisant une sonde Doppler à laser situé sur la peau. Ainsi, toute action pharmacologique qui provoque un changement dans la circulation sanguine cutanée peut être enregistrée. Cette approche a été utilisée pour évaluer le rôle du NO dans l'hyperémie postocclusive et thermique [104] et elle ouvre une nouvelle voie d'étude dans l'évaluation de la fonction endothéliale de la peau humaine.

### 2.2.2.5 Analyse spectrale vasomotrice

Les oscillations périodiques du flux sanguin cutané (flowmotion) peuvent être quantifiées par analyse spectrale des signaux. L'analyse spectrale peut être effectuée par la transformation de Fourier classique.



**Figure 6: Transformation de Fourier**

*Transformation de Fourier (TF) d'un signal périodique. La TF permet la recherche de composantes périodiques dans un signal. Le résultat est qu'une série temporelle (signal complexe, image de gauche) peut être exprimée comme le spectre de la fréquence (image de droite) et dévoile en revanche les fréquences propres qui constituent le signal, en les distinguant clairement du bruit.*

La transformée en ondelettes continue est une méthode avec une résolution de fréquence logarithmique qui est utilisée pour analyser le flux sanguin des vaisseaux. De cette manière, il a été démontré que l'activité endothéliale est un processus qui contribue aux oscillations du flux sanguin [105].

Cinq fréquences caractéristiques sont rapportées sur le spectre de fréquences disponibles. Ces oscillations représentent l'influence du battement de coeur (à 1 Hz), de la respiration (0,3 Hz), de l'activité myogène (0,1 Hz) et de l'activité neurogène (0,04 Hz). De plus, une oscillation à 0,01 Hz est observable et l'amplitude de cette fréquence peut être augmentée par l'administration d'acétylcholine par iontophorèse. Un enregistrement de 30 minutes est nécessaire pour l'étude des fréquences basses [106].

On pense que ces oscillations à 0,01 Hz dépendent de l'endothélium et pourraient être utilisées comme un test de la fonction endothéliale. En accord avec cette hypothèse, l'amplitude de la fréquence 0,01 Hz est plus élevée lors d'une stimulation par l'Ach plutôt que le SNP. L'inhibition de la NO synthase ne modifie pas l'amplitude de la réponse induite par l'Ach et ainsi le rôle de la production de NO dans la partie du spectre attribuée à la fonction endothéliale ne peut être établi [107].

### 2.2.2.5.1 Autres

Le Tableau 3 récapitule les tests microvasculaires non invasifs qui utilisent des agents pharmacologiques administrés par iontophorèse.

Test	Action endothéliale	Récepteurs	Effet	Mécanismes Possibles	Références
Acétylcholine	Endothélium dépendant	M3 récepteur muscarinique	VD	NO, prostaglandines, EDHF	[108-111]
Adrénaline (épinéphrine)	Endothélium indépendant	Récepteur alpha chez les cellules musculaires lisses	VC	Différents voies intracellulaires qui dépendent du type de récepteur alpha	[112]
Bradykinine	Endothélium dépendant	Récepteur $\beta_2$	VD	NO et production des eicosanoïde	[73, 111]
Bradykinine	Endothélium dépendant	Récepteur $\beta_2$	VD	NO, prostaglandines, hyperpolarization vasculaire	[112]
Bretylium	Endothélium indépendant	...	VD	Inhibition de la sécrétion de neurotransmetteurs des fibres neuronales	[113, 114]
C-peptide	Probablement Endothélium dépendant	Inconnu	VD	Activité Na/K-ATPase et NO	[115]
CGRP	Probablement Endothélium indépendant	Inconnu	VD	Directe ou indirecte stimulation des fibres sympathiques et des cellules vasculaires musculaires lisses	[116, 117]
Eau désionisée	Endothélium dépendant et Endothélium indépendant	Inconnu	VD	C fibres et prostaglandines	[118, 119]
Histamine	Endothélium dépendant et Endothélium indépendant	Récepteur H1 et H2	VD	H1: cellules endothéliales H2: effet direct sur les cellules vasculaires musculaires lisses	[120, 121]

Test	Action endothéliale	Récepteurs	Effet	Mécanismes Possibles	Références
Insuline	Endothélium dépendant et Endothélium indépendant	Récepteur de l'insuline	VD	NO, Na/K-ATPase	[122]
Methacholine	Endothélium dépendant	Recepteur Muscarinique	VD	NO, prostaglandines, EDHF	[111, 123]
Noradrénaline (norépinéphrine)	Endothélium indépendant	Récepteur alpha chez les cellules vasculaires musculaires lisses	VC	Différentes voies intracellulaires qui dépendent du type de récepteur alpha	[112]
Phenylephrine	Endothélium indépendant	Récepteur alpha chez les cellules vasculaires musculaires lisses	VC	Différentes voies intracellulaires qui dépendent du type de récepteur alpha	[93]
Sodium nitroprussiate	Endothélium indépendant	...	VD	Donneur de NO	[108, 110, 111, 124]
Substance P	Endothélium dépendant	Récepteur NK1	VD	Probable production de NO	[111]

*NK1 neurokinin 1; NOS, Synthase de l'oxide nitric; CGRP, calcitonin gene-related peptide; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor, VD Vasodilatation VC Vasoconstriction.*

**Tableau 3: Tests microvasculaires non invasifs avec intervention pharmacologique.**  
D'après [82].

## **2.2.3 Limites et problèmes techniques du laser Doppler**

### **2.2.3.1 Mesure de flux sanguin cutané plutôt que la vraie perfusion sanguine tissulaire.**

Une limite majeure de la technique du laser doppler est l'impossibilité de mesurer les valeurs absolues de perfusion (par exemple débit sanguin cutané en ml/min relatif au volume ou au poids du tissu). Les mesures dans la plupart des études sont exprimées en unités arbitraires de perfusion (PU) ou millivolts (1 PU = 10 mV) et sont souvent désignées comme des flux. Toutefois, cela ne permet pas la comparaison des valeurs du flux ou de la conductance absolue entre les études qui utilisent des sondes, des marques d'appareil ou des sites de mesure différents.

### **2.2.3.2 Absence du zéro biologique**

Le flux n'atteint pas la valeur zéro lorsque la perfusion est absente. Le mouvement brownien de macromolécules résultant de l'espace interstitiel contribue au signal restant lorsque le flux de globules rouges est absent. Il n'y a de ce fait pas de zéro biologique.

### **2.2.3.3 Variabilité spatiale**

Le laser Doppler se réfère à une technique à sonde unique dans laquelle la sonde est située sur la peau et est utilisée pour enregistrer des vitesses et des concentrations de cellules sanguines en mouvement dans un volume de 1 mm<sup>3</sup> ou moins, en fonction de sa longueur d'onde. En raison de la pénétration du signal, on enregistre la vitesse et la concentration de la boucle papillaire hypo-épidermique en plus des artérioles situées dans le derme médian et superficiel. Les premières sondes s'appuyaient sur une fibre laser unique et un enregistreur unique. Les nouvelles sondes sont plus sophistiquées et utilisent une seule fibre laser Doppler entourée de plusieurs fibres pour la réception du signal. Cela permet l'étude d'un volume plus important et minimise les variations spatiales et l'hétérogénéité du flux vasculaire cutané.



#### **2.2.3.4 Reproductibilité**

Le laser Doppler a souvent été considéré comme peu reproductible. Cependant, la principale source de variation est le site de mesure. Lorsque le site d'enregistrement est standardisé, la reproductibilité journalière de l'hyperémie post occlusive, hyperthermique et après Ach (exprimée en valeurs absolues) est bien corrélée avec le flux de la dilatation de l'artère brachiale après une ischémie, chacun ayant un coefficient de variation <10% [125, 126]. En revanche, le coefficient de variation normalisé par rapport au flux sanguin cutané est beaucoup plus élevé [85].

Chez les humains, le flux sanguin cutané est très sensible aux variations de la température ambiante. Ces problèmes peuvent être en partie surmontés en utilisant une chambre à température contrôlée ou une sonde chauffée à une température neutre (33.8°C). Même en utilisant ces précautions, le flux basal reste extrêmement variable [90].

#### **2.2.4 Déterminants**

L'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire et le développement de l'athérosclérose [127]. Les composants du syndrome métabolique, comme le diabète [128], l'HTA, la dyslipidémie et l'obésité, sont corrélés à la dysfonction endothéliale [129-132].

De nombreuses études ont mis en évidence une atteinte de la structure et de la fonction de la microcirculation artérielle lors de situations pathologiques (coronaropathie, atteinte vasculaire artérielle périphérique, diabète, hypertension). Des études récentes ont montré l'influence du surpoids ou de l'obésité et de l'insulino-résistance sur le recrutement capillaire post-occlusif [133] et la densité capillaire [132, 134, 135].

#### **2.2.5 Pronostic**

A notre connaissance il n'y pas eu des études prospectives sur la valeur prédictive du flux sanguin cutané (FSC) sur la morbi-mortalité cardiovasculaire.

La fonction microcirculatoire pourrait être corrélée à la fonction d'autres artères :

- Artériopathie périphérique : une étude de la vasomotricité de la microcirculation cutanée a été utilisée afin d'évaluer la maladie vasculaire périphérique [136] et les auteurs ont suggéré que le FSC pourrait être utilisé pour détecter rapidement la dysfonction des artères périphériques.

- Circulation coronaire : une autre étude a corrélé le FSC avec la perfusion myocardique chez des sujets sains. Le FSC restait représentatif de la fonction microvasculaire généralisée, y

compris celle de la circulation coronaire chez des sujets sains [137]. Les patients ayant un angor microvasculaire avec des coronaires saines semblent avoir une perte de la réserve de vasodilatation qui affecte non seulement leur circulation coronaire mais aussi leur lit artériel périphérique [138].

## 2.2.6 Résumé

- ❖ Le réflexe neuronal de la circulation de la peau humaine se fait des nerfs sympathiques vasoconstricteurs et vasodilatateurs noradrénergiques. Nous pouvons étudier le flux sanguin cutané avec l'utilisation du laser Doppler une technique basé sur la réflexion d'un faisceau de la lumière laser.
- ❖ Les avantages de cette technique sont la profondeur de mesures cutanée (~1–1.5 mm) et la possibilité des enregistrements de longue durée.
- ❖ Cette technique présente certaines limites comme les artefacts liés aux mouvements, l'impossibilité de mesurer les valeurs absolues de perfusion (par exemple l'expression du débit sanguin cutané en ml/min relatif au volume ou au poids du tissu), l'absence du zéro biologique, de la variabilité spatiale et de la mauvaise reproductibilité avec des variations selon le site de mesure.
- ❖ L'analyse spectrale vasomotrice avec la transformation de Fourier d'un signal périodique nous fournit des renseignements complémentaires (un enregistrement de 30 minutes est nécessaire pour l'étude des fréquences basses). Cette approche peut décomposer le signal en 5 fréquences: 1) oscillations qui représentent l'influence du battement de coeur (à 1 Hz), 2) de la respiration (0,3 Hz), 3) de l'activité myogène (0,1 Hz) et 4) de l'activité neurogène (0,04 Hz) et à la fin 5) l'oscillation à 0,01 Hz est dépendent de l'endothélium
- ❖ Nous pouvons mesurer la fonction endothéliale avec des méthodes de stimulation non pharmacologiques comme l'hyperémie thermique qui est une technique endothélium dépendent et l'hyperémie post-ischémique une technique qui est à la fois endothélium dépendent et indépendant ; les méthodes pharmacologiques soit sur l'administration par iontophorèse (sous l'influence d'un courant électrique de faible intensité) de substances comme l'Ach (réponse endothélium dépendant) soit par microdialyse (administration des substance dans l'espace interstitiel). L'utilisation par iontophorèse d'autres substances comme la bradykinine, la methacholine et la substance P peut évaluer la réponse endothélium dépendante.
- ❖ La nouvelle technique d'imagerie permet d'étudier une surface cutanée plus importante par rapport au laser Doppler classique, est l'imagerie de contraste utilisant la granularité laser (SPECKLE), son désavantage est que les mesures ne dépassent pas la profondeur de ~300 µm.
- ❖ Peu d'études ont corréler le flux sanguin cutané à la fonction d'autres artères comme dans le cas de de l'artériopathie périphérique ou la circulation coronaire.
- ❖ L'extrapolation des résultats sur la macrovascularisation et qui provient des études de microvascularisation et vice versa n'est pas évidente car les facteurs métaboliques sont probablement plus importants dans la régulation de la fonction microvasculaire et le dysfonctionnement microvasculaire est probablement un indicateur précoce du risque.
- ❖ A notre connaissance il n'y pas des données sur l'action des analogues d'insuline après échec des antidiabétiques oraux en association à la metformine et sur l'effet de l'état nutritionnel sur la microcirculation.

## 2.3 Rigidité artérielle

### 2.3.1 Physiologie

#### 2.3.1.1 Système circulatoire artériel

On estime que l'arbre artériel peut se décrire comme un modèle de type propagatif. Il consiste en un tube viscoélastique dont les propriétés élastiques génèrent une onde de pression incidente provenant du cœur. Les ondes sont réfléchies au niveau des bifurcations périphériques des artères de conduction et des artères musculaires plus petites, à résistance élevée. La géométrie, le nombre des artéioles et l'architecture du réseau de microvascularisation jouent un rôle important dans la réflexion de l'onde incidente.

La constriction artérielle et artériolaire conduit à des points de réflexion plus proches du cœur et à des ondes de réflexion aortique plus précoces [139, 140].

Par conséquent, la forme de l'onde de pression enregistrée au niveau de l'aorte ascendante peut être décrite comme la somme de l'onde de pression incidente générée par le cœur et de l'onde de pression réfléchie par la périphérie .

S'il n'y avait pas de réflexion, l'onde de pression de la racine de l'aorte serait atténuée. La connexion du réseau avec ses bifurcations génère des ondes réfléchies qui commencent avant la fin de la systole. L'onde de pression réfléchie ( $P_r$ ) à partir des branches artérielles est superposée à l'onde de pression incidente ( $P_i$ ) provenant du cœur pour générer l'onde de pression aortique ( $P = P_i + P_r$ ). L'onde de la pression réfléchie augmente la pression de la perfusion coronarienne (95% de la perfusion sous endocardique).

Les propriétés élastiques des artères de conduction varient le long de l'arbre artériel, les artères proximales étant plus élastiques et les artères distales plus rigides. Cette hétérogénéité dans la rigidité artérielle a des conséquences physiologiques et physiopathologiques importantes.

Les propriétés de l'onde de réflexion ont un effet considérable sur la charge du ventricule gauche. L'amplitude de la réflexion est déterminée principalement par les propriétés de la paroi des petites artères périphériques musculaires et les artéioles, alors que le moment (timing) de réflexion est déterminée principalement par les grandes artères élastiques [141].

Si une rigidité artérielle est présente, l'onde de pression réfléchie aura un retour beaucoup plus rapide et va modifier de façon significative l'onde de pression aortique.

En effet, une onde de pression propagée le long d'un tube viscoélastique sans site de réflexion est atténuée progressivement. Par contre, une onde de pression qui se propage le long d'un tube avec de nombreuses branches est progressivement amplifiée distalement en raison des ondes de réflexion. En particulier, dans les artères périphériques, la réflexion des ondes amplifie l'onde de pression en raison de sites de réflexion plus proches des sites périphériques que des artères

centrales.

### **2.3.1.2 Conséquences**

La rigidité artérielle induit un retour précoce de l'onde incidente pendant la systole, ce qui provoque une augmentation de la PA centrale, de la charge ventriculaire gauche et la diminution de l'aire sous la courbe de la pression diastolique x temps (DTI) [141]. Tous ces phénomènes peuvent augmenter le risque cardiovasculaire pour un accident vasculaire cérébral (AVC), l'hypertrophie du ventricule gauche et l'ischémie myocardique.

Les modifications des PA centrales ne sont pas détectées par la mesure de la PA périphérique.

L'augmentation de la PA systolique centrale (PAS-C) et de la pression pulsée (PP) centrale, c'est-à-dire la différence entre la PA systolique (PAS) et diastolique (PAD) augmentent le risque cardiovasculaire pour un AVC.

L'augmentation de la charge ventriculaire gauche augmente l'hyperertrophie ventriculaire gauche.

Le retour précoce de l'onde incidente pendant la systole diminue la perfusion coronaire et augmente le risque d'ischémie myocardique.

### **2.3.1.3 Phénomène d'amplification des pressions pulsées.**

On observe une amplitude de l'onde de pression plus élevée dans les artères périphériques que dans les artères centrales, appelée phénomène d'amplification. La pression pulsée (PP) est donc plus élevée en périphérie qu'au niveau central.

L'amplification résulte des oscillations périodiques d'ondes de pression, qui sont propagées et qui sont reflétées dans les artères caractérisées par des propriétés visco-élastiques non uniformes.

L'amplification de l'aorte à l'artère brachiale de l'onde de pression est atténuée chez des sujets âgés en raison de l'augmentation précoce de l'onde de réflexion et de l'augmentation rapide de la PAS centrale (PAS-C) et ainsi de la PP.

En outre, la PP périphérique n'est pas une évaluation fiable de la PP centrale chez les sujets jeunes car il existe une relation inverse entre l'amplification et la PAD. En revanche, les PP périphériques et centrales ne suivent pas de modifications parallèles chez les sujets plus âgés. De ce fait, la PP brachiale ne peut pas être utilisée comme un marqueur de PP aortique, en particulier chez des sujets jeunes [142].

#### 2.3.1.4 Variabilité de l'amplification des pressions pulsées

De façon physiologique, la PP aortique ou centrale (PP-C) est inférieure à la PP brachiale ou périphérique (PP-P) pour la même PA moyenne centrale (PAM-C) et la même PAD-C [143-145]. La différence entre PP-P et PP-C, appelé amplification de la PP, est d'environ 14 mm Hg [146] et peut être exprimée soit comme la différence soit comme le rapport entre ces deux pressions. Des études récentes ont montré que l'amplification de la PP pourrait être un meilleur facteur pour la prédiction du risque cardiovasculaire que les PA-C et PA-P seules, en particulier chez les sujets avec une insuffisance rénale sévère ou ayant une HTA essentielle et un âge avancé [143].

La PP-P devient supérieure à la PP-C quand l'onde sphygmique passe à travers des conduits artériels caractérisés par une réduction progressive de diamètre et une rigidité accrue. La réflexion d'ondes à partir de la périphérie exerce leur influence principale sur l'amplification des PP en augmentant la PAS-P plus que la PAS-C. Par conséquent, en condition physiologique, la charge pulsatile est plus faible dans les artères centrales que dans les artères périphériques, protégeant ainsi le cœur contre l'excès de charge [147].

L'amplification de la PP, très variable chez le même sujet et entre les sujets, est modulée par des facteurs non modifiables et modifiables : principalement la vieillissement vasculaire et la FC [148].

### 2.3.2 Exploration clinique de la rigidité artérielle

#### 2.3.2.1 Mesure de la vitesse de l'onde de pouls aortique

On estime que la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP) est une méthode robuste, reproductible, non invasive et simple permettant la détermination de la rigidité artérielle mesurée le long de l'aorte et de la voie aorto-iliaque [149]. L'aorte est considérée comme la plus intéressante cliniquement car l'artère et ses premières branches sont en rapport direct avec le ventricule gauche cardiaque et contribuent pour une majeure partie à la fonction d'amortisseur des artères [149]. Par ailleurs, la VOP aortique, comme nous le verrons plus tard, est un prédicteur indépendant d'événements cardio-vasculaires.

La VOP est la vitesse de l'onde de pression pendant la traversée d'un segment artériel. La base théorique de sa mesure dépend de l'équation de Moens-Korteweg :

$$VOP = \sqrt{\frac{(\text{Module de Young}) \times h}{2r\rho}}$$

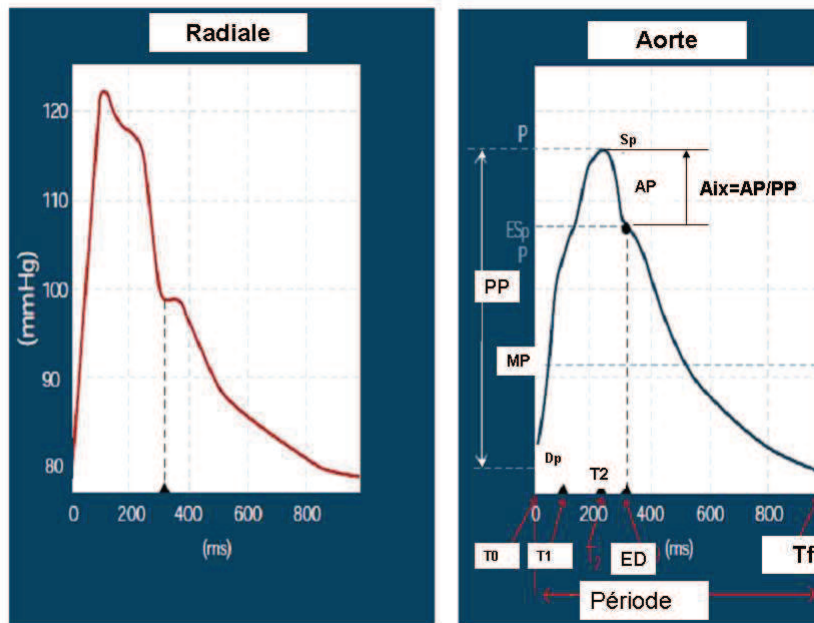
dans laquelle  $\rho$  est la densité du sang,  $h$  l'épaisseur et  $r$  le rayon de l'artère. Le module de Young est un paramètre physique qui représente la rigidité des matériaux élastiques. Plus une artère est rigide, plus le module de Young est élevé et plus l'onde de pouls circule rapidement dans l'artère. En pratique, la VOP est calculée en divisant la distance entre deux sites de mesure de l'onde de pression par le temps que l'onde de pression a mis pour aller du premier site au second site. Plusieurs méthodes non invasives permettent de calculer la VOP chez l'homme, utilisant des capteurs mécaniques de pression (Complior®), tonomètre d'aplanation (SphygmoCor®), échographe (Wall Track®, Artlad®) ou des systèmes doppler [139].

Le pied de l'onde est défini en fin de diastole, quand l'augmentation initiale de l'onde débute.  $t$  représente le temps de transit du pied de l'onde sur le segment artériel dont la longueur ( $L$ ) est mesurée. La VOP est le rapport entre  $\Delta L$  sur  $\Delta t$ .

### **2.3.2.2 Evaluation de l'onde de pouls central**

L'analyse de l'onde de pouls doit être effectuée au niveau central, car comme nous l'avons vu précédemment, les mesures au niveau brachial surestiment les mesures centrales, en particulier chez le sujet jeune en raison du phénomène d'amplification. L'onde centrale de pouls représente la vraie charge imposée au ventricule gauche et à la paroi des artères centrales larges.

Les mesures doivent donc être effectuées de façon optimale soit au niveau de la carotide, soit au niveau de l'aorte ascendante. Une alternative est l'évaluation de l'onde de pouls au niveau radial avec une fonction de transfert déterminant la forme de l'onde au niveau central. La forme de l'onde de pression peut être enregistrée de façon non invasive avec une sonde. La technique tonométrique permet l'enregistrement du pouls artériel au moyen d'un ou plusieurs capteurs ultra sensibles aux variations de pression et aux mouvements des tissus environnant l'artère étudiée. Basée sur le principe selon lequel la force nécessaire pour aplatir une artère est égale à la pression intra-artérielle, elle est applicable à toutes les artères de distribution superficielle : carotide, radiale, fémorale et pédieuse.



**Figure 7: Pouls périphérique (Radiale) et centrale (Aorte)**

Analyse d'une onde de pouls centrale (Aorte) synthétisée à partir de l'onde de pouls périphérique (Radiale) avec la fonction de transfert. La forme de l'onde de pression carotidienne est enregistrée par tonométrie d'aplanation. La hauteur du pic systolique tardif au-dessus du point d'inflexion définit la pression d'augmentation (AP), et le ratio de pression d'augmentation par rapport à la pression pulsée (PP) définit l'index d'augmentation  $AIx$  (en pourcentage). PA systolique et pression pulsée (PP) sont également des index de rigidité artérielle.



### **2.3.2.3 Evaluation de l'Index d'Augmentation**

Comme nous l'avons décrit plus tôt, la forme de l'onde de PA est un composite de l'onde incidente provenant du ventricule gauche et de l'onde réfléchie. Les ondes sont réfléchies à partir de la périphérie, essentiellement au niveau des branches artérielles.

Dans les vaisseaux élastiques, la VOP est lente et les ondes de réflexion ont tendance à survenir au moment de la diastole. Dans le cas d'artères rigides, la VOP augmente et l'onde de réflexion arrive au niveau des artères centrales plus tôt, s'additionnant à l'onde initiale et augmentant la PAS et donc la PP, toutes deux des index de rigidité artérielle. Ce phénomène est quantifié par l'index d'augmentation (Aix), défini par la différence entre les seconds et premiers pics systoliques et exprimé comme un pourcentage de la PP .

### **2.3.2.4 Index d'Augmentation et fréquence cardiaque**

Dans une étude dans laquelle la FC était stimulée par étapes à l'aide d'un pacemaker, l'augmentation de la FC diminuait l'Aix et la réduction observée était d'environ 5,6% pour chaque incrément de la FC de 10 battements/min. Dans la même étude, la VOP n'était pas associée à la FC. L'explication la plus probable est celle d'un transfert efficace de l'onde de pression réfléchie de la systole en diastole due au raccourcissement de la durée d'éjection, ce qui arrive avec une augmentation de la FC [150]. Afin qu'on puisse comparer les Aix sur les différentes FC, on utilise l'Aix ajustée sur une fréquence cardiaque de 75 battements/minute (Aix @75).

### **2.3.2.5 Dissociation entre l'Index d'augmentation et la VOP**

La PAS centrale, la PP centrale et l'Aix sont dépendants de la VOP, de l'amplitude de l'onde réfléchie, du point de réflexion et de la durée et de l'éjection ventriculaire. La VOP aortique représente de façon intrinsèque la rigidité artérielle au niveau de l'aorte. Certaines conditions physiopathologiques et certains médicaments peuvent changer la PP centrale et l'Aix sans changer la VOP aortique, suggérant un effet prédominant de l'onde de réflexion du pouls ou de l'éjection ventriculaire, sans changement de la rigidité aortique [149].

De ce fait, la VOP reste « l'étalon or » pour la mesure de la rigidité artérielle.

Dans une étude portant sur une population d'âge moyen et avancé [151], l'Aix n'était pas associé à la VOP et il existait une corrélation inverse entre l'Aix et les marqueurs de la rigidité aortique locale, indépendamment de l'âge, du sexe, de la taille, du poids et de la PAS. L'Aix

est l'indice le plus largement utilisé pour décrire l'onde de réflexion. L'augmentation de l'Aix a été associée à la survenue d'événements cardiovasculaires et à la mortalité. Pourtant, on doit préciser que l'Aix ne quantifie pas l'amplitude de l'onde de réflexion, mais plutôt l'interaction des ondes incidentes et réfléchies, car il exprime la pression télésystolique.

Par conséquent, l'Aix intègre à la fois l'amplitude et la synchronisation (timing) de ces deux ondes de pression et est influencé par plusieurs facteurs, qui modulent le couplage ventriculo-vasculaire, la FC (principalement de la durée d'éjection), la taille, la structure et la fonction ventriculaire gauche, la résistance vasculaire périphérique, la PAM et la rigidité aortique (donc de la VOP).

La dissociation entre l'Aix et la VOP peut être modulée par la présence de plusieurs facteurs, tels que le vieillissement, la résistance à l'insuline, l'activité du SNA, l'inflammation et le traitement par des médicaments (**Tableau 4**)[152].

<b>Auteur</b>	<b>Année</b>	<b>Journal</b>	<b>Pathologie ou traitement pharmacologique</b>
Lacy et al [153]	2004	J Hypertens	Diabète
McEniery et al [154]	2005	J Am Coll Cardiol	Vieillessement
Vlachopoulos et al [155]	2005	Circulation	Inflammation aiguë
Protogerou et al [156]	2007	Atherosclerosis	Syndrome Métabolique
Lemogoum et al [157]	2004	J Hypertens	Stimulation Beta-adrenergique.
Mitchell et al [158]	2005	Hypertension	Inhibiteur de l'enzyme de conversion /inhibiteur de vasopeptidase
Sakurai et al [159] (VOP: Mesures après un cathétérisme de l'aorte)	2007	J Hypertens	Nitroglycerine

**Tableau 4: Index d'Augmentation et VOP**

*Etudes qui ont rapporté une dissociation entre l'Index d'Augmentation et la VOP. D'après [152]*

Greenwald et al [160] ont suggéré que ces résultats pourraient être liés au changement de la distance efficace de réflexion, ce qui pourrait être le résultat de la vasodilatation au niveau des petites artères ou artérioles, résultant en une faible résistance périphérique totale. La sensibilité à l'insuline pourrait être un vecteur important dans la dissociation entre la VOP et l'Aix.

### **2.3.3 Déterminants de la rigidité artérielle.**

En plus de l'effet dominant de l'âge et de la PA [162, 163], les déterminants d'une augmentation de la rigidité artérielle sont l'obésité [164], l'intolérance au glucose [165], le syndrome métabolique [135, 166], le diabète de type 1 (DT1) et DT2 [167], le tabagisme [168], l'hypercholestérolémie [166]. Si l'insulino-résistance est un élément central dans la pathogénie de ces anomalies, nous ne disposons actuellement que de peu d'études explorant le rôle de l'alimentation sur le long terme. Nous développerons ici en particulier les facteurs métaboliques.

#### **2.3.3.1 DT1**

Il existe un grand nombre d'études montrant une augmentation de la rigidité artérielle chez les patients avec DT1 [169-179]. Ceci est un phénomène précoce qui se produit avant l'apparition des manifestations micro- ou macrovasculaires [174, 176]. En outre, la rigidité artérielle est élevée en présence de complications microvasculaires (par exemple, néphropathie, ou microalbuminurie ou rétinopathie) [180]. Des résultats similaires ont été rapportés sur la PP chez les personnes ayant un DT1. Une augmentation de la PP peut être détectée dès la troisième et la quatrième décennie de vie. Le vieillissement artériel est accéléré et la relation de PP avec l'âge est encore plus marquée en présence de complications microvasculaires [181]. Cependant, l'augmentation de la rigidité artérielle pourrait être aussi bien la cause (présence d'une plus grande rigidité artérielle associée à de plus grandes PA dans les petites artères et capillaires) que la conséquence de la microangiopathie (la diminution du réseau microvasculaire augmente la réflexion des ondes et la PP). Ceci est discuté, tout comme l'origine commune (par exemple, un dysfonctionnement endothélial et l'inflammation) des deux phénomènes [182]. Pris ensemble, ces données appuient le concept de vieillissement artériel accéléré dans le DT1 et peuvent expliquer, au moins en partie, l'augmentation du risque cardiovasculaire chez ces patients.

#### **2.3.3.2 Syndrome métabolique**

Les études portant sur l'association entre le syndrome métabolique et la rigidité artérielle ont constamment montré l'augmentation de la rigidité artérielle chez les individus atteints du syndrome métabolique ou avec un nombre d'éléments du syndrome métabolique [183-186]. Ces modifications artérielles délétères ont été trouvées à un très jeune âge (par exemple chez les obèses [187] adolescents et jeunes adultes [188, 189]). La rigidité accrue dans le syndrome

métabolique semble donc être causée par des anomalies métaboliques subtiles (et non par le diabète pleinement développé), ce qui confirme l'hypothèse d'une atteinte précoce. En outre, des études prospectives ont montré que l'augmentation de la rigidité artérielle avec l'âge est supérieure chez les personnes atteintes du syndrome métabolique par rapport à celles qui sont indemnes [190]. Le sexe modifie aussi les effets du syndrome métabolique sur la rigidité artérielle [156]. Lors d'une régression du syndrome métabolique, l'augmentation de la rigidité artérielle est ralentie [191].

### **2.3.3.3 DT2**

De façon similaire au DT1, le DT2 présente une augmentation de la rigidité artérielle [192-199]. Ceci est également un phénomène précoce [200] déjà présent dans l'état de prédiabète (hyperglycémie à jeun et/ou intolérance au glucose) [198, 201, 202]. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un terrain commun, ce qui suggère que les maladies macrovasculaires associées au DT2 commencent depuis l'état pré-diabétique [203]. En outre, la présence de complications micro- et macrovasculaires du DT2 est aussi associée à une augmentation de la rigidité artérielle [204-206]. Comme dans le cas du DT1, l'augmentation de la rigidité artérielle liée à l'âge est plus rapide chez les personnes atteintes de DT2 par rapport aux sujets non diabétiques [196]. L'augmentation des PP est encore amplifiée en présence de complications micro- et macrovasculaires [207]. La PP accrue observée chez les DT2 est un facteur prédictif de la mortalité cardiovasculaire [208].

### **2.3.3.4 Facteurs nutritionnels**

L'amélioration de la rigidité artérielle avec des interventions non pharmaceutiques a un grand intérêt et les effets des interventions diététiques et nutritives sur la rigidité artérielle ont montré des résultats prometteurs.

L'importance de la nutrition a été montrée dans des cohortes épidémiologiques dans lesquelles la consommation des légumes a été associée à une rigidité artérielle moindre (VOP plus basse de 0,5 m/sec). La diminution de la VOP semble être plus prononcée si les habitudes alimentaires ont commencé depuis l'enfance, ce qui met l'accent sur l'importance alimentaire dès l'enfance dans la prévention primaire des maladies cardiovasculaires [209].

L'administration de 330 ml/jour de jus de pamplemousse pendant 4 semaines a eu comme résultat la baisse de la PAS de 2,6 mmHg [210] et l'administration de 480 ml/ jour de jus de canneberge pendant 28 jours a diminué de 6% la VOP [211].

Les données actuelles reposent sur un certain nombre de petits essais d'intervention prospective de bonne qualité et suggèrent que la supplémentation en AG polyinsaturés oméga-3 et des isoflavones de soja offre un moyen de réduire la rigidité artérielle. De même, 2 études ont également suggéré que la consommation de produits laitiers fermentés qui contient des peptides bioactifs diminue la rigidité artérielle (Tableau 5). La supplémentation avec des protéines du lait associée à l'exercice réduit également la PAS, la réflexion des ondes et la rigidité artérielle chez les jeunes femmes obèses avec pré-HTA et HTA [212].

Intervention	Référence	Design	Durée (semaines)	N	Variable	Participants	Résultat
Ω-3	[213]	CS, DB, PC	Aiguë	20	VOP et AIx	Sujets sains	-
Ω-3	[214]	PG, DB, PC	12	38	CA	En surpoids	-
Ω-3	[215]	CS, DB, PC	6	20	CA	Diabétiques	↑CA
Ω-3	[216]	CS, DB, PC	12	38	Pulse stiffness	Sujets sains	-
Ω-3	[217]	PG, SB	12	92	VOP	Syndrome Metabolique	↓ VOP
Ω-3	[218]	PG, DB, PC	12	67	CA	En surpoids	↑CA
Ω-3	[219]	PG, DB, PC	8	52	CA	En surpoids, hypertension	↑CA
Ω-3	[220]	PG	52	84	PWV	Dyslipidemie	↑VOP chez le placebo
Ω-3	[221]	PG	105	60	VOP	DT2	↓ VOP
Lait fermenté	[222]	PG, DB, PC	24	89	AIx et Tr	Hypertension	↓ AIx et Tr (hommes)
Lait fermenté	[223]	PG, DB, PC	10	94	Rigidité artérielle en ambulatoire	Hypertension	↓ Rigidité

Tableau 5: **Rigidité artérielle et produits nutritionnels.**

*Interventions suite à l'administration des produits nutritionnels de provenance animale. Modifié d'après [224]. CA, Compliance artérielle ;CS, étude croisée; DB, double-aveugle ; PC, placebo, PG, groupes parallèles ;EPA, acide eicosapentaénoïque ; DHA, acide docosahexaénoïque; -: Pas d'effet significatif, Tr: Temps de réflexion de l'onde incidente.*

La restriction en sel est importante dans la gestion de la rigidité artérielle. Dans une étude récente, l'augmentation de l'apport en potassium, en plus d'un régime relativement faible en sodium, a eu un effet bénéfique sur la PA mais sans effet sur la rigidité au cours de 4 semaines

[225], ce qui était en contradiction avec les résultats d'une étude antérieure [226]. Les preuves pour recommander l'utilisation de vitamines dans le but de diminuer la rigidité artérielle sont insuffisantes. Ces études sont resumées dans le Tableau 6.

Intervention	Ref	Design	Durée	N	Variable	Sujet	Résultats
<b>Vitamines</b>			(semaines)				
Acide Ascorbique	[227]	PG, DB, PC	4	30	AIx, Tr, PAS-C, PAD-C	DT2	Amélioration de toutes les variables
Acide Ascorbique	[228]	PG, DB, PC	4	37	VOP	Insuffisance cardiaque	Pas d'effet
Vitamines C et E	[229]	CS, DB, PC	8	30	AIx et VOP	HTA non traité	Pas d'effet
Vitamine E	[230]	PG, DB, PC	12	41	CA	DT1	Pas d'effet
Folates	[231]	CS, DB, PC	3	41	CA et VOP	Hommes	Pas d'effet
Folates	[232]	PG, DB, PC	173	315	VOP, SAC, et AIx	Insuffisance rénale	Pas d'effet
Folates	[233]	PG, DB, PC	16	133	VOP	Maladie vasculaire	Diminution PWV
Folates et pyridoxine	[234]	PG, DB, PC	104	130	AC et AD	Descendants avec parents polyvasculaires	Pas d'effet
Vitamine C	[235]	CS, DB, PC	Aigue	26	VOP et AIx	Sains	Pas d'effet
Vitamine E	[236]	PG, DB, PC	192	409	CA	Fumeurs	Pas d'effet
Vitamine E	[237]	CS, DB, PC	10	20	VOP	Femmes post ménopausiques	Pas d'effet
<b>Micro nutriments</b>							
Acid a-Lipoic	[238]	CS, PC	Aigue	16	AIx et Tr	Sains	Pas d'effet
<b>Minéraux</b>							
Sel	[239]	CS, DB, PC	6	187	VOP et PP	HTA non traité	Placebo a réduit la PP et PWV
Sel	[240]	CS, SB, PC	4	34	VOP et AIx	HTA	Augmentation AIx et PWV
Potassium et bicarbonates	[226]	CS, DB, PC	4	42	VOP	HTA non traité	Diminution PWV

**Tableau 6: Rigidité artérielle vitamines et micronutriments.**

*Interventions par l'administration randomisée de vitamines, de micronutriments et minéraux D'après [224]. CS, étude croisé; DB, double-aveugle; PC, placebo, PG, groupes parallèles; EPA, acide eicosapentanoïque ; DHA, acide docosahexaénoïque, CA, compliance artérielle*



Enfin, bien que les effets chroniques de la caféine ne soient pas élucidés, il y a un niveau de preuve suffisant pour suggérer que la consommation de caféine augmente la rigidité artérielle en aiguë [224, 241]. Le Tableau 7 résume ces études.

Intervention	Référence	Design	Durée (semaines)	N	Variables	Participants	Résultats
Soja	[242]	PG, DB, PC	12	213	CA, VOP	Sains	Diminution VOP
Soja	[243]	CS, PC	8	40	AIx	Femmes en ménopause	Pas d'effet
Soja	[244]	CS, SB, PC	5	21	CA	Femmes en ménopause	Augmentati on de la compliance
Soja	[245]	CS, SB, PC	6	80	CA, VOP	Sains	Diminution VOP
Isoflavones	[246]	CS, SB, PC	5	25	VOP	En surpoids	Diminution VOP
Flavanole (thè noir)	[247]	CS, SB, PC	1	19	VOP	Sains	Pas d'effet sur la VOP
Alcool	[248]	CS, SB, PC	Aiguë	15	AIx et VOP	Maladie coronaire	Diminution AIx
Caféine	[249]	CS, SB, PC		16	AIx, CPs, et Tr	Sains	Augmentati on AIx
Caféine	[250]	CS, SB, PC	Aiguë	20	AIx et CPs	Sains	Augmentati on Aix
Caféine	[251]	CS, SB, PC	Aiguë	20	AIx et VOP	Sains	Augmentati on Aix et VOP
Ail	[252]	CS, SB, PC	12	75	VOP	Sains	Pas d'effet
Acide linoléique	[253]	CS, SB, PC	24	401	VOP	Sains en surpoids	Pas d'effet

**Tableau 7: Rigidité artérielle et nutriments végétales**

*Interventions randomisées avec des nutriments végétaux. D'après [224]*

*CS, étude croisé; DB, double-aveugle; PC, placebo, PG, groupes parallèles; EPA, acide eicosapentaénoïque ; DHA, acide docosahexaénoïque, CA, compliance artérielle*

### **2.3.3.5 Insuline et Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1).**

Une administration aiguë d'insuline a un effet vasodilatateur lent sur les vaisseaux périphériques [254]. En ce qui concerne les facteurs de régulation de l'Aix, l'insuline diminue de façon aiguë l'Aix, indépendamment des changements de la résistance vasculaire périphérique [5] et cette action de l'insuline est diminuée chez les sujets obèses résistants à l'insuline [255], les patients DT1 [256] et DT2 [257]. Ces résultats suggèrent que la résistance à l'insuline pourrait contribuer à la régulation de l'Aix chez les patients atteints de DT2.

Après administration d'insuline pendant 6 mois, la diminution de l'Aix reste présente bien que l'insuline ait diminué les résistances périphériques [258] et des grandes artères [259].

Après un traitement par liraglutide (un analogue du GLP-1) associé à la metformine vs metformine seule pendant 12 semaines, il n'y a aucune différence entre les 2 groupes sur la pression d'augmentation et l'Aix@75. L'absence d'effet sur la rigidité artérielle a été aussi observée sur une étude avec un inhibiteur de DPP4 (qui augmente le GLP-1) vs un sulfamide hypoglycémiant (qui augmente l'insulinémie) [260].

A ce jour, il n'y pas des données sur la réponse postprandiale physiologique ou après un traitement par insuline ou par analogue de GLP-1, les données publiées ont utilisé la technique du clamp euglycémique.

## **2.3.4 Déterminants de l'amplification des pressions pulsées**

### **2.3.4.1 Déterminants non modifiables**

Comme nous l'avons vu précédemment, le vieillissement est le facteur non modifiable principal associé à une diminution de l'amplification PP, comme le montrent les données transversales des sujets sains [154, 261]. Avec le vieillissement, la charge cardiaque tend à augmenter, en raison d'une augmentation de la rigidité artérielle brachiale au niveau aortique ce qui augmente la PP centrale par rapport la PP périphérique et réduit l'augmentation PP [1].

Le vieillissement est le facteur non modifiable principal associé à une diminution de l'amplification PP, comme le montrent les données transversales des sujets sains [154, 261].

Ceci est associé au fait que "le vieillissement vasculaire normal" est le modulateur principal de la rigidité des grandes artères et de l'augmentation de réflexions d'ondes, mais pas de façon linéaire [154].

Le sexe est le deuxième déterminant non modifiable important : les femmes ont une amplification de la PP inférieure à celle des hommes [148]. Cette observation est en accord avec la constatation que les femmes ont un AIX plus élevé. La taille est positivement associée à l'amplification de la PP, et la taille est inversement corrélée à l'AIX aortique. Ces observations peuvent être expliquées en partie seulement par le retard de la synchronisation de l'onde réfléchie en diastole, due à une plus grande distance du site «majeur» de réflexions (distance efficace de réflexion) chez les hommes ; les vaisseaux qui sont plus petits et plus rigides chez les femmes peuvent jouer un rôle important [262].

### **2.3.4.2 Déterminants modifiables**

L'accumulation des données à partir d'études transversales suggère que les sujets qui présentent des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels, tels que l'HTA, le diabète, l'hypercholestérolémie, le tabagisme ou des maladies cardiovasculaires présentent une amplification de PP réduite, indépendante de l'âge, du sexe, de la taille et du rythme cardiaque. Mis à part des modifications physiques dans la paroi artérielle attribuable à ces facteurs de risque cardiovasculaire, une augmentation aiguë de la PAM peut augmenter la rigidité artérielle et les vagues de réflexion, conduisant ainsi à une réduction aiguë de l'amplification. En effet, il existe une relation inverse entre la PAS moyenne et l'amplification de PP chez les sujets hypertendus non traités, bien que cette relation puisse être modifiée après un traitement [263].

Les sujets obèses et hypertendus avec un syndrome métabolique concomitant ont une

amplification élevée de PP [264]. Cependant, ces résultats sont principalement secondaires à la présence de FC élevées et d'ondes de réflexion atténuées chez ces patients.

La FC et les facteurs non modifiables (vieillesse et sexe) semblent être des facteurs prédictifs les plus importants de l'amplification de la PP par rapport aux facteurs traditionnels modifiables (HTA, diabète, tabagisme, hypercholestérolémie) [148].

## **2.3.5 Pronostic cardiovasculaire**

### **2.3.5.1 Pression artérielle centrale : organes cibles et mortalité**

Les données de la littérature montrent que la PA-C est un meilleur prédicteur des atteintes des organes cibles que la PA brachiale. Par exemple, elle est mieux corrélée avec le diamètre interne de la carotide et l'épaisseur de l'intima-média que la PA brachiale [265]. La PAS-C est un déterminant de la masse ventriculaire gauche [266]. La PP-C est plus fortement reliée à la masse vasculaire de l'artère carotide, l'épaisseur intima-média et le score athéromateux des plaques carotidiennes que la PP brachiale [144].

En 2002, Safar et ses collègues ont publié la première preuve clinique de la valeur pronostique de la mesure de la PA-C. Chez les patients présentant une maladie rénale sévère, la PP-C mesurée sur la carotide est un prédicteur important de la mortalité toute cause et cardiovasculaire, alors que la PP brachiale n'avait pas de valeur prédictive pour la mortalité [145].

Kaess et al. ont étudié de façon prospective chez les participants de la cohorte de descendants de Framingham les relations entre hémodynamique vasculaire et HTA. La rigidité aortique, l'amplitude de l'onde incidente et l'Aix étaient associées à un risque élevé de développer une HTA [267].

Dans l'étude Strong Heart portant sur 2403 participants sans antécédent cardiovasculaire à l'entrée de l'étude, avec un suivi moyen de 4,8 ans, la PP-C prédisait les événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, maladie coronarienne, insuffisance cardiaque, mort d'origine cardiaque et accident vasculaire cérébral) plus fortement que la PP brachiale [144]. Enfin, Cheng et al. ont récemment proposé que le seuil pour l'HTA serait une PA-C  $\geq 130/90$  mmHg [268].

### **2.3.5.2 VOP et mortalité**

Un grand nombre d'études a examiné la rigidité artérielle comme facteur de prédiction le risque de futurs événements CV (décès, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, revascularisation, accident vasculaire cérébral) et la mortalité totale [269] (Tableau 8). Les propriétés élastiques artérielles sont de plus en plus utilisées pour la stratification du risque dans plusieurs populations. Récemment, les Sociétés européennes d'hypertension et de cardiologie ont proposé des recommandations pour la gestion de l'HTA et ont suggéré que la mesure de la VOP aortique pouvait être utilisée comme un outil d'évaluation de l'impact infraclinique de l'HTA sur les organes cibles [270].

Premier Auteur	Population	Age	% Hommes	Suivie	VOP (seuil)
Année (Ref. #)		(ans)		(ans)	
Anderson et al., 2009 [271]	Population générale (n = 174)	60 ± 10	51.1	19.6	>10.6 m/s (tertile sup)
Blacher et al., 1999 [272]	IR terminale (n = 241)	51.5 ± 6.3	61.0	6.0	>12.0 m/s (tertile sup)
Boutouyrie et al., 2002 [273]	Hypertension (n = 1,045)	51 ± 12	65.0	5.7	>12.3 m/s (tertile sup)
Choi et al., 2007 [274]	Angor (n = 497)	57.7 ± 0.1	47.7	2.6	>12.5 m/s (tertile sup)
Cruickshank et al., 2002 [275]	Diabète (n = 394)	60 ± 10	60.0	10.7	augmentation de 3.8-m/s
Laurent et al., 2001 [276]	Hypertension (n = 1,980)	50 ± 13	65.5	9.3	augmentation de 5-m/s
Mattace-Raso et al., 2006 [277]	Population générale (n = 2,835)	71.7 ± 6.7	39.0	4.0–9.0	>14.6 m/s chez les hommes ; >14.2 m/s in women (tertile sup selon l'âge)
Meaume et al., 2001 [278]	Sujets >70 ans (n = 141)	87.1 ± 6.6	27.0	2.5	>17.7 m/s (decile sup)
Mitchell et al., 2010 [279]	Population générale (n = 2,232)	63 ± 12	42	7.8	>9.3 m/s (median)
Pannier et al., 2005 [280]	IR terminale (n = 305)	53.1 ± 6.2	62.0	5.8	Tertile Sup
Shoji et al., 2001 [281]	IR terminale (n = 265)	55.4 ± 0.5	41.0	5.3	>8.2 m/s (median)
Shokawa et al., 2005 [282]	Minorité ethnique (n = 492)	63.7 ± 8.8	44.7	10.0	>9.9 m/s (Seuil calculé apartir d'une courbe ROC)
Sutton-Tyrrell et al., 2005 [283]	Sujets âgés (n = 2,488)	73.7 ± 2.9	48.0	4.6	>8.4 m/s chez l'homme; >7.9 m/s chez la femme (median selon l'age)
Terai et al., 2008 [284]	Hypertension (n = 676)	62 ± 12	55.0	4.8	>8.8 m/s (median)
Wang et al., 2010 [285]	Population générale (n = 1,272)	52 ± 13	53	15	2,3 m/s augmentation chez l'homme 2,5 m/s augmentation chez la femme
Willum-Hansen et al., 2006 [286]	Population générale (n = 1,678)	40–70	52.0	9.4	>13.1 m/s (quintile sup)

**Tableau 8: Etudes de mortalité et VOP.**  
D'après [269]

### **2.3.5.3 AIX et mortalité**

L'association entre l'AIX et les facteurs du risque cardiovasculaire traditionnels a été analysée dans plusieurs études avec une méthodologie différente et des résultats divers [287]. L'AIX est associée à un risque accru de maladies cardiovasculaires chez les populations à haut risque [288, 289] et chez les hommes [290], tandis que son caractère pronostique chez les femmes [291] et dans la population générale n'est pas prouvé [279].

On notera que, dans une grande étude en population générale, l'association entre AIX et facteurs de risque dépendait de l'âge : l'âge ayant une influence plus importante sur l'AIX que les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires traditionnels [292].

L'AIX est aussi un facteur modifiable après une intervention pharmacologique [293, 294]. En revanche, sa fiabilité comme mesure de la compliance vasculaire est remise en cause chez les sujets âgés [154]. La mesure de l'AIX est plus facile et nécessite moins de temps que celle de la VOP [295].

### **2.3.5.4 Implications pour l'intervention médicamenteuse**

La PP élevée reflète l'augmentation de la rigidité des troncs artériels et est associée à un risque accru d'événement cardiovasculaire notamment chez les sujets âgés [296, 297]. La PP-C et l'AIX ont probablement une meilleure valeur pronostique [145]. La VOP aortique est un facteur prédicteur indépendant de la mortalité chez les diabétiques et les insuffisants rénaux dialysés [298]. Le meilleur paramètre devra être à la fois un bon prédicteur, facile à réaliser avec une bonne reproductibilité et peu coûteux. Pour l'instant, tous ces paramètres sont utilisés et le brassard à tension n'est pas encore détrôné.

Certains antihypertenseurs pourraient fournir une protection des organes cibles au-delà de leur effet sur la diminution de la PA brachiale. Ces grands essais multicentriques, comparant deux traitements actifs, comprennent la Second Australian National Blood Pressure Study [299], Losartan intervention pour End Point Réduction de l'hypertension (LIFE) [300], Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT) [301] et ACCOMPLISH [302]. Toutes les études ont montré des avantages cliniques d'une stratégie de réduction de la PA par les inhibiteurs des canaux calciques ou par un inhibiteur du système rénine-angiotensine (inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) ou antagoniste des récepteurs de l'angiotensine (ARA2)). Ces thérapeutiques étaient supérieures aux traitements basés sur un  $\beta$ -bloqueur (BB) ou sur un diurétique thiazidique, pour un même niveau de la PA brachiale.

Le plus grand essai contrôlé randomisé mené pour tester l'hypothèse d'un bénéfice clinique de

la réduction des PA-C était l'étude Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) [303] pendant laquelle les PA-C étaient mesurées par tonométrie d'aplanation. Malgré une PAS brachiale similaire entre les groupes de traitement ( $\Delta$  0,7 mm Hg; P = 0,2), l'amlodipine réduisait plus la PAS-C ( $\Delta$  4,3 mm Hg; p <0,0001) et la PP-C ( $\Delta$  3,0 mm Hg; P <0,0001) que l'aténolol. Ces réductions des PA-C ont été associées à une réduction significative des événements cardiovasculaire et du développement de l'insuffisance rénale. Le Tableau 9 résume l'effet de certaines classes d'antihypertenseurs sur l'Aix et la VOP.

<b>Classe médicamenteuse</b>	<b>Aix</b>	<b>VOP</b>
<b>Diurétiques</b>	Pas d'effet	Pas d'effet
<b>Inhibiteurs des canaux calciques (dihydropyridines)</b>	Amélioration	Amélioration
<b>Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion</b>	Amélioration	Amélioration
<b>Antagonistes du récepteur de l'angiotensine</b>	Amélioration	Amélioration

**Tableau 9: Traitements antihypertenseurs et rigidité artérielle**  
Effets des traitements antihypertenseurs sur les indices de la rigidité artérielle. D'après [304]

Une autre étude prospective ouverte à plus petite échelle a cherché à déterminer l'utilité de la PA-C pour guider la gestion de l'HTA et la décision thérapeutique. Le résultat étonnant de cette étude était l'arrêt du traitement chez 16% des participants dans le groupe avec des mesures de la PA-C. Dans ce groupe il y a eu une diminution progressive importante de la dose quotidienne [305]. Malgré cela, il n'y avait pas de différence entre les groupes sur l'indice de masse ventriculaire gauche, la mesure ambulatoire sur 24 heures de la PA, la PAS ou la rigidité aortique. L'utilisation de ces mesures pourrait aider à diminuer les complications iatrogènes et individualiser le traitement anti hypertenseur.



### 2.3.6 Résumé

- ❖ La forme de l'onde de pression enregistrée au niveau de l'aorte ascendante peut être décrite comme la somme de l'onde de pression incidente générée par le cœur et de l'onde de pression réfléchiée par la périphérie
- ❖ Ce phénomène a comme conséquence dans le cas de la rigidité artérielle le retour précoce de l'onde incidente pendant la systole, ce qui provoque une augmentation de la PA-C, de la charge ventriculaire gauche et la diminution de la perfusion myocardique pendant la diastole avec une augmentation du risque cardiovasculaire
- ❖ L'amplification des PP résulte des oscillations périodiques d'ondes de pression, la PP-P devient supérieure à la PP-C quand l'onde sphygmique passe à travers des conduits artériels ce qui a comme résultat l'amplification des pressions pulsées.
- ❖ La rigidité artérielle peut être mesurée par la vitesse de l'onde de pouls (VOP), la PA-C et par l'Aix
- ❖ L'Aix intègre à la fois l'amplitude et la synchronisation (timing) de ces deux ondes de pression et est influencé par plusieurs facteurs, qui modulent le couplage ventriculo-vasculaire, la FC (principalement de la durée d'éjection), la taille, la structure et la fonction ventriculaire gauche, la résistance vasculaire périphérique, la PAM et la rigidité aortique (donc de la VOP).
- ❖ La dissociation entre l'Aix et la VOP peut être modulée par la présence de plusieurs facteurs, tels que le vieillissement, l'activité du SNA, l'inflammation et le traitement par des médicaments.
- ❖ La sensibilité à l'insuline pourrait modifier la distance efficace de réflexion, ceci pourrait être le résultat de son action vasodilatatrice au niveau des petites artères ou artérioles, résultant en une faible résistance périphérique totale (à cause de l'augmentation du recrutement capillaire).L'insuline diminue de façon aiguë l'Aix indépendamment des changements de la résistance vasculaire périphérique [5]. La sensibilité à l'insuline pourrait être un vecteur important dans la dissociation entre la VOP et l'Aix.
- ❖ L'amélioration de la rigidité artérielle avec interventions diététiques et nutritives sur la rigidité artérielle ont montré des résultats prometteurs (diminution de la VOP jusqu'à 0,5 m/sec).

- ❖ Avec le vieillissement, en raison d'une augmentation de la rigidité artérielle la PP centrale augmente beaucoup plus au niveau aortique par rapport la PP périphérique et réduit le ratio d'augmentation PP [1].
- ❖ Les données de la littérature montrent que la PA-C est un meilleur prédicteur des atteintes des organes cibles que la PA brachiale.
- ❖ Le plus grand essai contrôlé randomisé mené pour tester l'hypothèse d'un bénéfice clinique de la réduction des PA-C sur la morbi mortalité était l'étude Conduit Artery Function Evaluation (CAFE)
- ❖ Dans une méta-analyse récente la relation plus importante de la PAS-C par rapport à brachiale avec des indices cardiaques et vasculaires de dysfonctionnement subclinique. Ces résultats soutiennent l'hypothèse physiologique que la PAS-C est plus représentative de la charge hemodymanique imposée aux organes cibles [4].
- ❖ La mesure de la PAS-C peut être utilisée sur la pratique clinique pour l'individualisation du traitement antihypertenseur et éviter les effets secondaires iatrogènes surtout sur la population des sujets âgés.
- ❖ A la question quel paramètre utiliser? Il y a toujours de nouveaux indices comme la pression du réservoir (PRI) qui sont intéressants. Dans une analyse rétrospective des données de l'étude CAFE [6] qui peut être estimée à partir de la forme d'onde de pression et correspond au travail hydraulique minimum théorique nécessaire pour produire le volume d'éjection est corrélée avec la pression de l'onde réfléchie et de prédit des événements cardiovasculaires chez les patients à haut risque.
- ❖ L'intégrale de l'excès de pression (XSPI) c'est à dire la différence entre la PAS de l'onde mesurée et de la pression du réservoir représente un indice de travail supplémentaire effectuée par le ventricule dans chaque cycle cardiaque, reste un facteur de la dysfonctionne circulatoire et prédit les événements cardiovasculaires
- ❖ A ce jour, il n'y pas des données sur la réponse postprandiale physiologique post prandiale ou après un traitement par insuline, les données publiées ont utilisé la technique du clamp euglycémique.

## **2.4 Le système nerveux végétatif ou autonome (SNA)**

Le SNA régule des fonctions dont certaines échappent au contrôle volontaire, comme la régulation du système cardio-vasculaire dont nous parlerons en particulier dans cette thèse. Le SNA peut ainsi avec la sécrétion des catécholamines et des réseaux neuronaux participer à la régulation des rythmes circadiens de la PA et de la FC [306]. En outre, il est responsable de l'adaptation aux situations de stress, comme des réponses de type "fight or flight", l'orthostatisme, l'exercice physique, le choc thermique ou émotionnel [307].

### **2.4.1 Physiologie**

#### **2.4.1.1 Architecture du SNA**

Le SNA se compose de deux parties anatomiques et fonctionnelles distinctes : le système sympathique et parasympathique.

##### **2.4.1.1.1 Voies afférentes**

Les fibres afférentes se dirigent vers le système nerveux central et apportent les informations des chémorécepteurs et des barorécepteurs situés dans les parois de la veine cave, des oreillettes, des ventricules ou des veines pulmonaires. Les fibres afférentes commandent les réponses réflexes des muscles lisses des différents organes et la FC.

Les informations sont véhiculées dans les fibres afférentes cheminant dans le nerf vagal ou dans le réseau sympathique épicaudique. Leur rôle est l'adaptation réflexe de la fonction cardiovasculaire aux variations de charge imposées au myocarde [308]. On considère classiquement que ces fibres constituent des afférences nociceptives et sont responsables de la sensation de douleur cardiaque, coronarienne ou vasculaire périphérique.

##### **2.4.1.1.2 Voies efférentes**

Les fibres pré-ganglionnaires de la moelle épinière se terminent dans les ganglions du tronc sympathique, transmettant eux même un signal à médiation cholinergique aux fibres post-ganglionnaires. Ces fibres sont adrénérgiques, le neuromédiateur étant la noradrénaline (NA). Le rapport entre les fibres pré- et post-ganglionnaires est de 1/20. Chaque nerf sympathique établit également une synapse dans les ganglions sus- et sous-jacents. La multiplicité de ces connexions explique la diffusion de la réponse sympathique au-delà du segment d'où provient le stimulus.

Les fibres nerveuses sympathiques pour le cœur et les vaisseaux proviennent de la région thoraco-lombaire entre le premier segment dorsal et le deuxième ou le troisième segment

lombaire. Les fibres issues du ganglion stellaire sont particulièrement importantes, celles issues du côté droit innervent préférentiellement l'oreillette droite et la région sino-atriale, et celles issues du côté gauche innervent préférentiellement le ventricule gauche [308].

Les deux catécholamines endogènes sont l'adrénaline et la noradrénaline et ont une activité agoniste sur les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergiques.

Les vaisseaux et le cœur ont des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  :  $\alpha_1$  au niveau des vaisseaux (leur stimulation induit une vasoconstriction),  $\beta_1$  au niveau cardiaque (actions inotrope et chronotrope positives) et  $\beta_2$  au niveau des vaisseaux (vasodilatation) (**Tableau 10**).

<b>Tissu</b>	<b>Récepteur</b>	<b>Stimulation Sympathétique</b>	<b>Stimulation Parasympathétique</b>
<b>Coeur</b>	$\beta 1, \beta 2$	FC $\uparrow$ Contractilité $\uparrow$ Conduction $\uparrow$	FC $\downarrow$ Conduction $\downarrow$
<b>Artéριοles</b>			
<b>Peau</b>	$\alpha 1$	Constriction	–
<b>Viscères abdominaux.</b>	$\alpha 1$	Constriction	–
<b>Reins</b>	$\alpha 1$	Constriction	–
<b>Muscle</b>	$\alpha 1, \beta 2$	Constriction (plus faible)	–
<b>Foie</b>	$\alpha 1, \beta 2$	Glycogénolyse Gluconéogenèse	–
<b>Tissu adipeux</b>	$\beta 3$	Lipolyse	–
<b>Glandes sudoripares</b>	Muscarinique; $\alpha 1$	Transpiration	–
<b>Médullosurrénale</b>	Nicotinique	Sécrétion d'adrénaline, noradrénaline $\uparrow$	–
<b>Estomac</b>			
<b>Motilité</b>	$\alpha 1, \beta 2$	Diminution	Augmentation
<b>Sphincters</b>	$\alpha 1$	Contraction	Relaxation
<b>Sécrétion</b>			Stimulation
<b>Intestine</b>			
<b>Motilité</b>	$\alpha 1, \beta 2$	Diminution	Augmentation
<b>Sphincters</b>	$\alpha 1$	Contraction	Relaxation
<b>Sécrétion</b>			Stimulation
<b>Pancreas</b>			
<b>Exocrine</b>	$\alpha$	Sécrétion d'enzymes $\downarrow$	Sécrétion d'enzymes $\uparrow$
<b>Endocrine</b>	$\alpha, \beta,$ Muscarinique	Sécrétion d'insuline $\downarrow$	Sécrétion d'insuline $\uparrow$
<b>Rein</b>	$\beta 1$	Sécrétion de Rénine $\uparrow$	–

**Tableau 10: Activité du SNA et spécificité tissulaire.**

*Effets de l'activité du SNA sur certains tissus. D'après [310].*

Le neuromédiateur au niveau des fibres pré et post-synaptiques est l'Ach. Les récepteurs cholinergiques peuvent être de 2 types : muscariniques (au niveau des organes comme le cœur) et nicotiques (ganglion végétatif). Le Tableau 11 résume les caractéristiques des neurotransmetteurs et leur site de sécrétion.

	<b>Acétylcholine</b>	<b>Noradrénaline</b>	<b>Adrénaline</b>
<b>Site de sécrétion</b>	Neurones préganglioniques du SNA, tous les neurones parasympathiques postganglioniques et quelques neurones sympathiques postganglioniques dirigés vers les glandes sudoripares	La plupart des neurones postganglioniques et 20% de la sécrétion de la médullosurrénale	80% de la sécrétion de la médullosurrénale
<b>Récepteur</b>	Nicotinique Muscarinique (cholinergique)	$\alpha 1, \alpha 2, \beta 1$ (adrénergique)	$\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ (adrénergique)
<b>Terminaison de l'activité</b>	Dégradation enzymatique par la cholinestérase	Recaptage par les terminaisons nerveuses; diffusion de la synapse, transformation métabolique par la monoamine oxydase (au sein de terminaison nerveuse) ou par la catéchol-O -méthyl-transférase au sein du foie.	Transformation métabolique par la catéchol-O -méthyl-transférase au sein du foie

**Tableau 11: Caractéristiques des neurotransmetteurs**  
D'après [310].

## 2.4.1.2 Regulation du SNA cardiovasculaire

### 2.4.1.2.1 *L'arythmie respiratoire sinusale*

L'arythmie respiratoire sinusale (ARS) est la fluctuation au cours du cycle respiratoire de la FC de battement à battement. L'ARS agit afin d'amortir les fluctuations de la PA et a pour fonction physiologique de coordonner la perfusion et la ventilation pulmonaire et augmenter l'oxygénation [311, 312]. L'hypercapnie est associée à l'augmentation de la FC et de l'amplitude de l'ARS. L'amplitude de l'ARS peut donc augmenter indépendamment de la diminution de la FC. [310]

Les mécanismes de l'ARS sont multiples :

- Dilatation mécanique du nœud sino-atrial pendant l'inspiration Bernardi et al. [313] ont été les premiers à démontrer que l'ARS était toujours présente chez les patients après une transplantation cardiaque, bien que l'amplitude de l'ARS soit réduite à 2-8% de la réponse normale. Cette observation a été confirmée par d'autres groupes et il est maintenant admis que les changements de la pression intrathoracique pendant la respiration résultent de la dilatation et la relaxation du nœud sino-atrial et produisent de petites augmentations de la FC pendant l'inspiration.

-Mécanismes centraux

L'influence centrale de l'activité respiratoire sur le contrôle vagal et sympathique cardiaque est aussi généralement admise [314].

-Pressions intrathoraciques

Le troisième mécanisme contribuant à l'ARS est que la diminution de la pression intrathoracique qui se produit pendant l'inspiration produit une diminution du volume d'éjection du ventricule gauche, produisant une diminution de la PA. Cette diminution de la PA conduirait à une augmentation de la FC par la médiation du baroréflexe observé pendant l'inspiration.

Il y a cependant deux arguments contre le rôle des baroréflexes. L'élimination de la stimulation auriculaire par un pacemaker diminue en même temps les oscillations de la PA mais augmente les fluctuations de la PA. Ce résultat suggère que l'ARS n'a pas agi comme un tampon par le biais des baroréflexes sur les fluctuations de la PA [315]. L'autre argument contre un rôle du rétrocontrôle des baroréflexes dans la genèse de l'ARS est le temps requis pour cette réponse [314]. La latence temporelle entre les changements de la PA et l'arrivée de la prochaine onde P est trop réduite pour que ce mécanisme contribue à la ARS.

#### **2.4.1.2.2 Barorécepteurs**

Les barorécepteurs sont localisés d'une part dans le mur des grosses artères systémiques du thorax et plus particulièrement au niveau du sinus carotidien et de la crosse aortique (barorécepteur de haute pression) et d'autre part au niveau de l'oreillette droite et des vaisseaux pulmonaires (barorécepteurs à basse pression). Les impulsions issues des barorécepteurs carotidiens, non détectées en dessous d'une PA de 60 mmHg, sont progressivement croissantes avec l'élévation de la PA. Ces impulsions n'augmentent plus lorsque la PA dépasse 180 mmHg [316, 317].

#### **2.4.1.3 Régulation à court terme de la pression artérielle**

Dans les conditions physiologiques, la régulation à court terme de la PA est essentiellement sous la dépendance de deux arcs réflexes inhibiteurs : le premier est lié au système artériel à haute pression et le deuxième au système à basse pression au niveau cardiaque. Les centres et les efférences sont communs et leur fonctionnement est complémentaire. La pression stimule des mécanorécepteurs sensibles à la déformation qui seront par la suite à l'origine d'une freination du tonus sympathique permanent, proportionnelle au stimulus.

L'importance du contrôle baroréflexe dans l'adaptation hémodynamique au changement de posture est fondamentale. Lors du passage rapide de la position couchée à la position debout, on observe classiquement une chute de la PA dont l'origine est probablement une vasodilatation musculaire insuffisamment compensée par l'augmentation du débit cardiaque. Dans ces circonstances, la diminution des décharges issues des barorécepteurs carotidiens provoque une diminution des influx inhibiteurs vers les centres vasomoteurs qui induit une inhibition vagale et une activation sympathique. Celle-ci se traduit par une augmentation de la FC, de la contractilité et du tonus vasomoteur [317].

En revanche, le système baroréflexe est peu impliqué dans la régulation à long terme de la PA. En effet, les barorécepteurs se recentrent en quelques heures autour d'un niveau de PA seuil, quel que soit le niveau de ce seuil.



#### **2.4.1.4 Régulation gastro-intestinale et SNA**

Le bon fonctionnement de l'appareil gastro-intestinal est essentiel pour la digestion, l'absorption et le transport de la nourriture et des résidus. La digestion nécessite la sécrétion de fluides endogènes provenant des glandes salivaires, de l'estomac, du pancréas et de l'intestin grêle pour faciliter la répartition intraluminaire des aliments; les fluides, les électrolytes et les petits blocs de construction des macronutriments seront ensuite absorbés, laissant des résidus non digestibles qui seront excrétés

##### **2.4.1.4.1     *Fonction sécrétoire***

###### **- Sécrétion salivaire**

La stimulation olfactive, la vue, la présentation de la nourriture dans la bouche déclenchent la stimulation des nerfs afférents qui activent les centres médullaires sécrétoires. Ces réflexes utilisent les fibres efférentes des voies parasympathiques et sympathiques : parasympathique avec le nerf sublingual et le nerf glossopharyngien vers les glandes sous-maxillaires et la parotide. Les synapses avec les fibres post-ganglionnaires se trouvent dans ou à proximité des glandes salivaires. Les fibres sympathiques innervent les glandes salivaires par l'intermédiaire du tronc sympathique cervical, mais les centres du tronc cérébral sont mal connus. Les fibres efférentes parasympathiques stimulent la sécrétion ductulaire, les fibres sympathiques servent à provoquer la contraction des cellules myoépithéliales du canal.

Les glandes salivaires humaines produisent 0,5 à 1,0 litre de salive par jour à un débit maximum de 4 ml/min. La salive facilite la parole, lubrifie la nourriture pour la déglutition et contient de l'amylase, qui commence la digestion de l'amidon. Les bicarbonates dans la salive neutralisent les ingesta acides pouvant être nocifs.

###### **-Digestion acide : sécrétion gastrique**

La sécrétion gastrique est stimulée par la vue, l'odorat (phase céphalique) et l'arrivée de la nourriture dans l'estomac (phase gastrique). L'arrivée de la nourriture dans l'intestin commande également par rétroaction une partie de la sécrétion gastrique (phase intestinale). Le fluide sécrété contient de l'acide chlorhydrique, la pepsine sécrétée sous forme de pepsinogène, le facteur intrinsèque, des bicarbonates et du mucus. La sécrétion gastrique d'acide et de pepsinogène suit la stimulation des voies afférentes vagues. Les voies efférentes vagues forment des synapses avec les neurones du plexus sous-muqueux, qui sont connectés avec des cellules sécrétrices par l'intermédiaire de la gastrine, l'histamine et la somatostatine. L'estomac est principalement le lieu de la digestion acide, mais également le lieu de début de la digestion des glucides et des protéines. Dans cet organe, l'absorption est faible à l'exception

de certaines substances liposolubles. La présence d'une couche de mucus protège la muqueuse de l'estomac de l'autodigestion par la sécrétion acide.

### **-Digestion alcaline : sécrétion pancréatique et biliaire.**

Le pancréas est constitué de façon physiologique de deux parties : exocrine et endocrine.

Seule la sécrétion exocrine sera rappelée dans ce paragraphe.

Le suc pancréatique se compose d'une composante hydro-électrolytique alcaline riche en bicarbonates et d'une composante enzymatique. Son volume quotidien est de 200 à 800 ml en fonction des ingestats. La sécrétion enzymatique (trypsine, lipase, amylase) est essentielle à la digestion des protéines, des lipides et des hydrates de carbone apportés par l'alimentation.

Les bicarbonates et le fluide sont sécrétés par les cellules ductulaires, sous l'influence de sécrétine, alors que les enzymes sont produites par les cellules acineuses en réponse à la stimulation vagale des neurones pancréatiques cholinergiques. La cholécystokinine (CCK), libérée par les cellules entéro-endocrines de la muqueuse du duodénum après stimulation chimique par les aliments, active la sécrétion d'enzymes pancréatiques via la stimulation des voies afférentes vagales.

La bile est continuellement sécrétée par le foie sous forme de deux fractions. La fraction hydro-électrolytique, indépendante de sels biliaires, est sous le contrôle de la sécrétine et la CCK. Elle est semblable à la sécrétion hydro électrolytique pancréatique. La deuxième fraction contient des sels biliaires.

La libération de la bile est contrôlée par le stockage dans la vésicule biliaire et par le sphincter d'Oddi. En période postprandiale, la vésicule biliaire se contracte sous l'effet de la stimulation vagale et de la CCK. La résistance du sphincter de l'ampoule de Vater diminue afin de permettre le passage de la bile vers le duodénum. En période de jeûne, la sécrétion pancréatico-biliaire est associée à la phase III du complexe moteur migrant intestinal.

### **-Sécrétion intestinale et absorption**

L'intestin grêle produit environ 5 litres de fluide par jour permettant l'équilibre des charges osmotiques induites par nutriments ingérés afin d'autoriser la digestion intraluminaire. D'un point de vue hydrique, la plus grande partie des 7 litres transitant chaque jour dans le tube digestif est réabsorbée (environ 80% dans l'intestin grêle, 20% dans le côlon) lors du flux de chyme organisée à travers l'intestin grêle et le côlon. Le poids fécal est environ 200 g/jour dans des conditions physiologiques.

Les flux hydriques et des électrolytes sont généralement indépendants du contrôle neuronal extrinsèque, mais dépendent du système nerveux entérique. Le plexus sous-muqueux est en effet un élément clé du flux sanguin muqueux et de la fonction des entérocytes.

L'absorption des micronutriments est généralement déterminée par les gradients de concentration pour le transport passif ou par des transporteurs actifs. Ces derniers sont indirectement influencés par le système nerveux autonome par ses effets sur la sécrétion salivaire, gastrique ou pancréatique.

#### **2.4.1.4.2      *Organisation de la motricité intestinale***

La fonction des cellules musculaires lisses gastro-intestinales est contrôlée par la libération des peptides et par le système nerveux intrinsèque (ou entérique). Cette régulation fait intervenir le SNA extrinsèque, parasymphatique (nerf vague, et parasymphatique sacré issu des racines S2, S3 et S4) et sympathique. Schématiquement, l'activité parasymphatique augmente la motricité intestinale alors que l'activité sympathique l'inhibe.

Les cellules musculaires lisses gastro-intestinales forment un syncytium dans lequel la stimulation qui induit la contraction de la première cellule peut être transmise à l'ensemble des cellules des tuniques longitudinales et circulaires de l'intestin. Le pace maker de ce syncytium est généré par le réseau de cellules interstitielles de Cajal, qui servent à coordonner la contraction de l'intestin.

Chez l'homme, le système nerveux entérique est formé d'une série des plexus ganglionnaires, sous-muqueux (Meissner), myentérique (Auerbach) et le plexus profond mésenchymateux (Cajal). Le nombre de neurones entériques, environ 100 millions, est à peu près équivalent au nombre de neurones dans la moelle épinière.

Au niveau du diaphragme, le nerf vague est composé principalement de fibres afférentes. Le concept classique selon lequel les fibres vagales font relai avec quelques neurones moteurs est discuté du fait du grand nombre de cellules effectrices devant se connecter avec un plus petit nombre de nerfs pré ganglionnaires. Le concept actuel est que chaque fibre vagale commande un circuit intégré dans la paroi intestinale et peut provoquer une réponse motrice ou sécrétoire spécifique.

Ces circuits du système nerveux entérique sont également importants dans la plupart des réponses automatisées de l'intestin, comme le réflexe péristaltique, qui persiste même dans un intestin totalement dénervé. Les nerfs entériques modulent également l'activité pacemaker. Les pacemakers qui sont situées sur la grande courbature gastrique et sur le bulbe duodéal induisent la fréquence intrinsèque maximum de contractions caractéristique du segment

digestif : 3 par minute dans l'estomac et 12 à 14 par minute dans le duodénum. Comme dans le cœur, dans le cas d'un dysfonctionnement du stimulateur, c'est la région la plus proche avec la plus grande fréquence qui prend le relais. Un bon exemple du dérèglement du contrôle neuronal extrinsèque des cellules musculaires lisses est la gastroparésie diabétique et l'incontinence anale après traumatisme obstétrical. D'autres pathologies sont caractéristiques de dysfonction du système nerveux entérique comme l'achalasia ou la maladie de Hirschsprung.

## **2.4.2 Méthodes d'exploration du SNA cardiovasculaire**

### **2.4.2.1 Recherche clinique de la neuropathie autonome cardiaque**

Les explorations du SNA reposent indirectement sur les mesures de réponses cardiovasculaires. En raison de la double innervation cardiaque, on conçoit que les résultats des épreuves autonomiques peuvent refléter une réduction de l'activité parasympathique ou une augmentation de l'activité sympathique ou inversement. L'étude de la variabilité de la FC et de la PA est réalisée au cours des épreuves de respiration profonde, d'orthostatisme et de Valsalva. Les épreuves peuvent être effectuées facilement au lit du malade ou en ambulatoire [319].

Le patient doit être en décubitus et au repos depuis au moins de 30 minutes. L'exploration doit être réalisée à distance d'éventuels excitants du système cardiovasculaire (café, thé, tabac, alcool, stress, effort physique...). Il faut tenir compte des situations exposant à toutes modifications de la FC qui peuvent en conséquence influencer sur les résultats des épreuves tels que la présence d'une valvulopathie avec insuffisance cardiaque, la fièvre, une anémie, l'insuffisance respiratoire, l'insuffisance coronarienne ou les médicaments.

#### **2.4.2.1.1 Epreuve de respiration profonde**

L'épreuve est réalisée en demandant au patient en décubitus dorsal de faire pendant une minute 6 cycles de respiration profonde et progressive dont chaque cycle se compose de 5 secondes en inspiration profonde, suivies de 5 secondes en expiration profonde. La moyenne des rapports de FC minimale (en expiration) et maximale (en inspiration) est calculée et comparée à la courbe de corrélation de l'épreuve avec l'âge chez des sujets témoins (**Figure 8**).

#### **2.4.2.1.2 Epreuve d'orthostatisme**

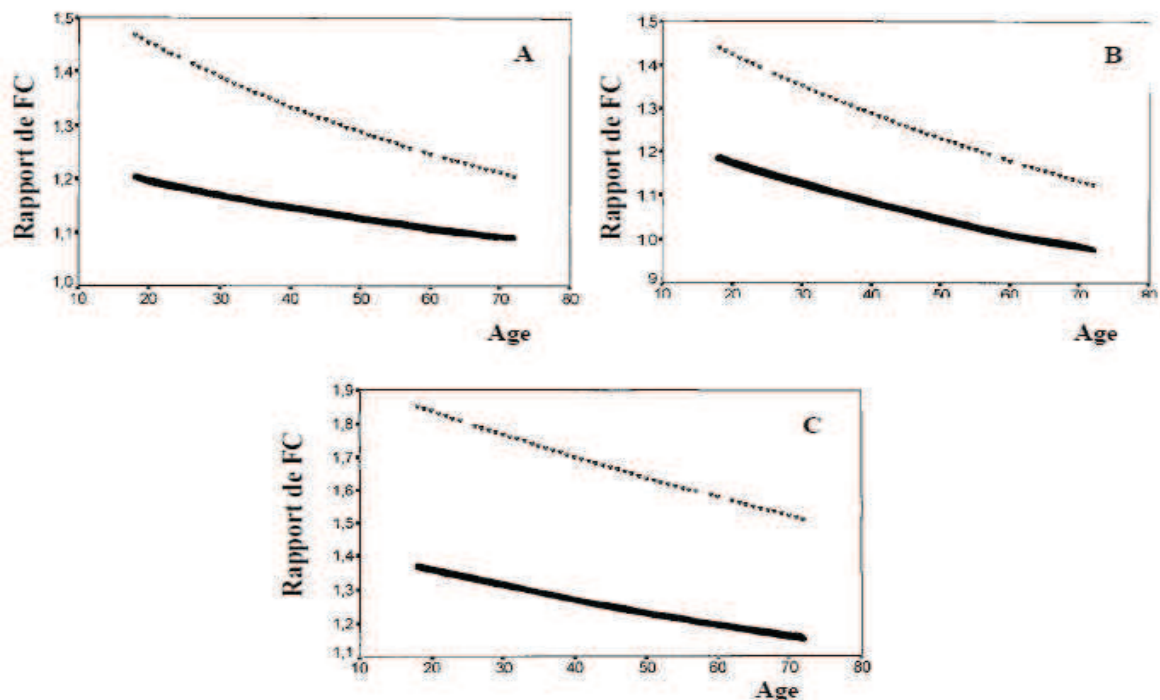
Le passage à l'orthostatisme, soit de façon active, soit grâce à une table basculante, accélère physiologiquement la FC dès les premières secondes. Cette accélération atteint son maximum à la 15<sup>ème</sup> seconde. Ensuite, la FC se ralentit et atteint son minimum à la 30<sup>ème</sup> seconde. Le rapport entre FC minimale pendant les 30 dernières secondes sur FC maximale pendant 15 premières secondes est calculé et interprété en fonction de courbes de corrélation de l'épreuve avec l'âge chez des sujets témoins (**Figure 8**).

### 2.4.2.1.3 Epreuve de Valsalva

L'épreuve de Valsalva est réalisée en position assise en demandant au patient de souffler dans un embout relié à un manomètre (Valsalva) jusqu'à atteindre 40 mmHg de pression pendant 15 secondes.

L'épreuve consiste à augmenter la pression à l'intérieur du thorax afin d'élever la pression à l'intérieur des artères pulmonaires et des veines situées en périphérie. Le retour veineux de sang vers le cœur est alors diminué. Cette manœuvre entraîne une bradycardie (diminution de la FC) s'accompagnant d'une diminution du volume du cœur et des gros vaisseaux. Le but recherché est de créer une sollicitation du nerf vague passant à proximité des poumons. L'excitation de ce nerf a pour but de ralentir la FC.

Le rapport de la FC minimale pendant l'épreuve Valsalva sur la FC maximale après Valsalva est calculé et ensuite interprété selon la courbe de corrélation avec l'âge chez des sujets témoins (**Figure 8**).



**Figure 8:** *Epreuves pour le diagnostic de la NAC*  
Courbes de corrélations entre les résultats des épreuves de respiration profonde (A), d'orthostatisme (B) et de Valsalva (C) avec l'âge chez des témoins[320]. La ligne pointillée correspond à la régression exponentielle entre le rapport de FC et l'âge. Les résultats d'un patient peuvent être situés graphiquement par rapport à la ligne du 5e percentile (trait gras).

La NAC est considérée comme débutante si une des trois épreuves est anormale, est confirmée lorsque 2 épreuves sont anormales et est sévère si les 3 épreuves sont anormales.

L'interprétation des épreuves doit être prudente dans certaines conditions qui sont

susceptibles d'influencer la variation de la FC telles que les cardiopathies (insuffisance coronaire stable, infarctus aigu du myocarde, insuffisance cardiaque congestive et cœur transplanté (cœur dénervé)), l'insuffisance rénale chronique, l'HTA, l'obésité, les pathologies neurologiques centrales (maladie de Parkinson, la dégénérescence spinocérébelleuse, le syndrome dysautonomique de Shy-Drager et la sclérose en plaque); en cas d'association à une neuropathie périphérique (alcoolisme chronique, syndrome de Guillain Barré, les agents neurotoxiques); avec l'administration de médicaments (atropine, beta bloquants et beta agonistes inhibiteurs calciques, sédatifs, analgésiques, agents anesthésiques, ventilation artificielle) [321].

#### **2.4.2.1.4 L'hypotension orthostatique**

L'hypotension orthostatique est définie comme la chute de la PA (20 mm Hg systolique ou 10 mm Hg pour la diastolique) en réponse à un changement de posture de la position couchée à debout [322]. L'hypotension artérielle est un signe de NAC avancée.

#### **2.4.2.1.5 Epreuve «handgrip»**

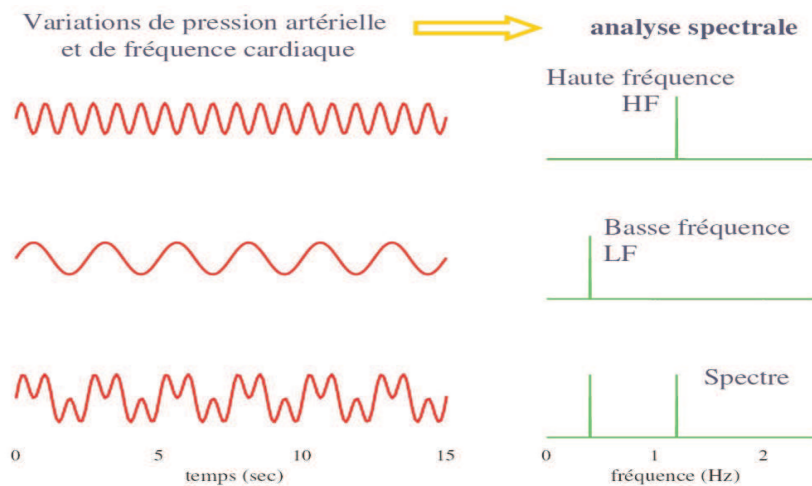
L'épreuve « handgrip » repose sur la réalisation d'une contraction isométrique de la main à l'aide d'un dynamomètre après avoir déterminé la contraction maximale que peut effectuer le sujet. Les résultats de ces méthodes dépendent essentiellement de l'activité sympathique.

#### **2.4.2.2 Mesure de la variabilité de la fréquence cardiaque**

La variabilité de la FC fournit des informations importantes à propos de la modulation autonome du système cardio-vasculaire et peut être identifiée par la mesure des domaines temporels et fréquentiels. Les mesures du "domaine temporel" sont des indices simples de la variabilité globale. Les indices du domaine fréquentiel, et de même, la "puissance totale" (variance de tous les intervalles  $RR < 0.4$  Hz mesurée en  $ms^2$ ) dérivée de l'analyse spectrale donnent toutes des informations sur la variabilité globale de la FC et représentent - au sens large - un indice de l'activité parasympathique.

##### **2.4.2.2.1 Analyse spectrale de la variabilité de la FC.**

Les indices dits "domaine de fréquence" peuvent identifier les composants spécifiques de la variabilité de la FC avec l'analyse spectrale des fluctuations de l'intervalle RR (qui correspond à celles de la FC) et d'autres signaux (Figure 9).



**Figure 9: Transformée en spectre**

*Schématisme de la décomposition du signal de PA ou de FC en une somme d'ondes sinusoïdales, transformée en spectre de haute (HF) et basse fréquence (LF)*

Les enregistrements spectraux à court terme (de 5 à 10 minutes) sont caractérisés par les composants de très basse fréquence (very low frequency : VLF-FC), haute fréquence (high frequency : HF-FC) et basse fréquence (low frequency : LF-FC), tandis que les enregistrements à long terme comprennent une composante ultra basse (ultralow frequency : ULF) en plus des trois autres :

- Composantes LF : typiquement de 0,03 à 0,15 Hz

La composante LF-FC, environ 0,1 Hz, qui représente un rythme de 10/seconde (ondes de Mayer), est associée au réflexe de barorécepteur [323].

La composante VLF-FC, jusqu'à 0,04 Hz, est liée aux fluctuations de la vasomotricité associée à la thermorégulation.

- Composante HF-FC

En théorie, les fréquences de 0,15 à 0,40 Hz représentent la composante respiratoire, mais la respiration doit être vérifiée afin de calculer l'étendue exacte de la puissance respiratoire.

- Le rapport LF/HF de la variabilité de la FC

Ce rapport représente la balance sympathico-vagale. En outre, la contribution relative des LF et HF peut être obtenue par le % de LF-FC et HF-FC sur la somme de la puissance (LF + HF) [324-326];

- Les composantes restantes de la variabilité de la FC (en particulier à LF et ULF) n'ont aucune valeur spécifique.

L'information tirée de l'analyse spectrale de l'intervalle RR sans avoir l'enregistrement simultané de la respiration et de la PA peut être biaisée car la puissance LF absolue ne représente pas l'activité sympathique. Avec le contrôle ou l'enregistrement de la respiration et



l'enregistrement simultané de PA, le ratio LF/HF et la puissance du spectre LF et HF mesurée en termes relatifs (unités normalisées) peuvent fournir une proportion approximative de la modification sympathique (LF) et parasympathique (HF).

Parmi les algorithmes possibles, pour l'analyse spectrale, l'autorégression est préférable.

Avec l'analyse spectrale, une évaluation plus fiable de la modulation sympathique peut être obtenue par la puissance spectrale des fréquences basses (LF) de la PAS (LF-PAS, cf 2.4.2.3) ou le débit sanguin de la microcirculation.

#### **2.4.2.2.2** *Analyse suivant la durée de l'enregistrement*

Les mesures de la variabilité de la FC peuvent être obtenues à partir d'enregistrements à court et à long terme.

##### **-Enregistrements courts**

En tant que telle, l'information tirée de l'ECG doit être complétée par l'enregistrement d'au moins la respiration et la PA avec chaque battement. L'enregistrement peut durer 4-5 minutes, de préférence sous respiration spontanée, mais il faut demander au sujet de maintenir une respiration régulière et d'éviter les respirations profondes, même occasionnelles (soupirs). Il faudra sélectionner un sous-ensemble de données lors d'une respiration stable. Les enregistrements doivent être effectués de préférence en position couchée. Des enregistrements additionnels peuvent être obtenus de manière similaire pendant 4-5 minutes en position verticale [327].

Les sujets ayant des pratiques spéciales (par exemple, de yoga, arts martiaux) ont tendance à ralentir naturellement leur fréquence respiratoire. Si ce phénomène très courant n'est pas reconnu, alors l'interprétation des pics spectraux pourrait être incorrecte. En conséquence, la définition stricte de la bande HF peut conduire à des erreurs significatives dans des conditions spéciales si la respiration est prévue pour varier au-delà des limites imposées. En l'absence d'un signal respiratoire, la respiration doit être soigneusement contrôlée à 15 respirations/minute. Il faut prendre soin d'éviter l'hyperpnée et l'hypocapnie consécutive.

##### **-Enregistrements sur 24 heures**

Lorsqu'il est difficile de contrôler la respiration ou qu'il n'y pas de données de PAS, seuls les intervalles RR sont considérés. Dans cette situation, des informations cliniques importantes sur les changements horaires et les rythmes circadiens (sur un enregistrement de 24 heures) de l'équilibre sympathico-vagal peuvent être obtenues en calculant les différents spectres. Une approche plus robuste est d'obtenir un spectre unique pour chaque heure d'enregistrement [328, 329]. Ceci est particulièrement utile lorsque on utilise l'approche autorégressive, car elle extrait un plus petit nombre d'informations relatives aux oscillations les plus récurrentes et

fournit une estimation plus robuste des changements circadiens de la modulation autonome. Inversement, si des changements plus rapides sont à étudier (par exemple pour tester les modifications autonomes causés par des événements ischémiques aigus), une fenêtre de données de 5 minutes est généralement suffisante [327].

### 2.4.2.3 Mesure de la variabilité de la pression artérielle

La modulation sympathique du tonus vasculaire est le résultat de l'action du système nerveux central, de la transmission ganglionnaire, de la conduction nerveuse sympathique, de la libération, de la diffusion et de la liaison des neurotransmetteurs aux récepteurs et à la fin de la cascade de signalisation intracellulaire associée aux interactions de l'actine et de myosine. Les ondes de Mayer sont des changements cycliques de la PAS. Les ondes de Mayer proviennent de l'activation sympathique qui se produit à des fréquences comprises entre 0,075 et 0,15 Hz chez l'homme. Le Tableau 12 récapitule l'impact de l'activation du SNA, de l'action des cellules musculaires lisses, du NO et de la rénine angiotensine sur les composants du spectre de la PAS.

	Fréquence	Fonction	
<b>VLF</b>	0.02-0.07 Hz	Cellules musculaires lisses	Système rénine/angiotensine(?)
<b>LF</b>	0.2-0.6 Hz	Activation sympathique	Cellules musculaires lisse/NO endothéliale
<b>HF</b>	1.0-4.0 Hz	Peut être NO endothéliale	

**Tableau 12: Composants de la variabilité de pression artérielle**

D'après [330]. *VLF*, very low frequency; *LF*, low frequency; *HF*, high frequency; *NO*, nitric oxide

Il existe actuellement deux théories :

- la théorie du stimulateur suggère que les oscillateurs autonomes au sein du système nerveux central génèrent des fluctuations périodiques de l'activité du SNA qui se traduisent par des oscillations correspondantes de la PA et de la FC. Cependant, les fréquences des oscillateurs du système nerveux central identifiées dans la plupart des études sont différentes de la fréquence des ondes de Mayer.
- La deuxième théorie implique les baroréflexes car le réflexe artériel du barorécepteur présente une résonance proche de la fréquence à laquelle se produisent spontanément les vagues de Mayer [330]. Les données expérimentales chez le rat sont en faveur de cette

théorie. En effet, elles montrent une réponse de la fréquence de la PA suite à des stimulations périodiques de nerfs aortiques proche de la fréquence des ondes de Mayer : on pourrait reproduire les ondes de Mayer par stimulation des barorécepteurs [331]. En revanche, l'activation sympathique ne semble pas participer à l'initiation et/ou l'entretien des cette ondes.

#### **2.4.2.4 Sensibilité des baroréflexes (BRS)**

##### **2.4.2.4.1 *Méthodologie de mesure de la BRS.***

L'approche clinique est généralement limitée à la branche cardiaque-vagale du baroréflexe artériel. Avec une méthodologie plus complexe, impliquant par exemple l'aspiration au niveau de cou ou la microneurographie, il est nécessaire de tester le bras vasculaire sympathique du baroréflexe. Le baroréflexe cardio-vagal peut être estimé par différentes méthodes consistant à mesurer la variation de la FC (intervalle RR) en réponse à un changement de PAS. Le changement de PA peut être spontané ou provoqué (par exemple par des médicaments ou une manœuvre de Valsalva).

Cela implique au moins *i)* une mesure continue de la PA et *ii)* une mesure continue et synchronisée de l'intervalle RR.

Le principal inconvénient de la mesure est le coût des dispositifs capables de fournir la mesure de la PA battement par battement. Les dispositifs non invasifs fournissent de bonnes estimations des fluctuations de PA et certains d'entre eux contiennent des logiciels qui fournissent des estimations utilisant l'intervalle entre les pulsations comme un substitut de la FC. Bien qu'acceptable chez les sujets sains, la mesure est moins précise dans des conditions de faible variabilité de la FC, qui peut se produire chez les patients atteints d'une neuropathie autonome cardiaque (NAC). De ce fait, une estimation des FC avec un électrocardiogramme est beaucoup plus fiable.

##### **2.4.2.4.2 *Méthodes utilisées pour évaluer le baroréflexe***

###### **- Changements de la PA induits par l'administration des médicaments**

La méthode nécessite une perfusion de courte durée d'un médicament qui augmente rapidement (par exemple, la phényléphrine) ou diminue (par exemple le nitrite d'amyle) la PA [332]. Pendant l'augmentation ou la diminution du réflexe, l'intervalle RR est enregistré avec la PA. Bien que la relation qui en résulte soit de type sigmoïde, la partie centrale possède une bonne linéarité et permet de mesurer la pente BRS en ms/mmHg.

## **- Changements de la PA induits par des manœuvres physiques**

L'approche la plus couramment utilisée est la manœuvre de Valsalva : les changements de l'intervalle RR, en particulier après la libération de la manœuvre, sont reportés en fonction de l'augmentation de la PA et une pente linéaire (similaire à celle de la méthode précédente) est obtenue.

## **- Fluctuations spontanées de la PA**

Les fluctuations spontanées de la PA sont détectées par les barorécepteurs artériels et donc les variations de FC sont le résultat de l'action continue des barorécepteurs artériels. Pour obtenir des valeurs significatives, un enregistrement d'au moins 2 à 4 minutes (selon différentes méthodes et algorithmes) de l'état stable est suffisant. Les deux approches les plus souvent utilisées sont les suivantes :

- La technique de séquences [333] est basée sur l'idée que chaque augmentation de la PA en présence d'un allongement de l'intervalle RR (ou inversement une diminution de la PA en présence d'un raccourcissement de l'intervalle RR) peut être considérée comme la preuve de l'intervention de baroréflexes artériels. Lorsque ces séquences affectent 3 ou plusieurs battements cardiaques consécutifs, une pente linéaire est calculée. Si le coefficient de corrélation est  $> 0,85$ , la pente est considérée comme significative. La ligne de base BRS est obtenue par la moyenne des pentes positives ou négatives qui se produisent au cours d'une période de stabilité en position couchée.
- Les méthodes basées sur l'analyse spectrale [334] supposent qu'une fluctuation donnée de PA est détectée par les barorécepteurs artériels et provoque une fluctuation réflexe de l'intervalle RR à la même fréquence. Les fluctuations de la PAS et de FC sont obtenues par l'analyse spectrale des deux signaux. Différents algorithmes mathématiques peuvent être appliqués et la transformée de Fourier rapide et l'autorégression sont le plus largement utilisées. En conséquence, différents indices de BRS peuvent être calculés comme le rapport entre amplitude des fluctuations de l'intervalle RR et celle des fluctuations de la même fréquence de la PA. A basse fréquence (LF), le BRS est représenté par le ratio  $LF-FC / LF-PAS$ . De même, à haute fréquence (HF), le BRS peut être obtenue par le rapport  $HF-FC / HF-PAS$ . La moyenne de ces deux mesures est appelée coefficient alpha ou alpha BRS. Afin de vérifier que les fluctuations dans l'intervalle RR sont en effet liées aux fluctuations de la PAS, un test de cohérence est généralement effectuée. Si la cohérence est  $> 0,5$  ; alors on peut supposer qu'une fluctuation donnée est synchrone dans les deux signaux et peut être utilisée pour calculer le baroréflexe.

L'indice de baroréflexe appelé "fonction de transfert" est la moyenne du spectre combiné obtenu à partir de l'intervalle RR et PA (spectre croisé), divisé par le spectre LF-PAS (0.05-15Hz) [16]. Les procédés ci-dessus fournissent dans une certaine mesure des valeurs semblables, mais des résultats différents peuvent être obtenus par de légères modifications de chacune des techniques mathématiques adoptées. D'autre part, aucun des procédés décrits jusqu'ici ne s'est révélé avoir un avantage par rapport aux autres. Cependant, une signification clinique différente pour les différentes méthodes ne ressort pas clairement à ce jour [327]. Une autre approche pratique [335, 336] est d'effectuer un test pendant 4 à 5 minutes de respiration spontanée et de garder une valeur moyenne des tests effectués.

On peut estimer le BRS par le simple rapport des écarts-types de l'intervalle RR et de la PAS. Cette approche a été récemment décrite et validée sur 1409 sujets avec différentes pathologies et correspond effectivement à l'information moyenne fournie par toutes les autres méthodes non invasives spontanées. La méthode est simple et facile à normaliser et semble donc très prometteuse pour les essais cliniques [336]. Les valeurs normales des BRS avec ces méthodes vont de 20-30 à 9-10 ms / mmHg, avec une diminution légèrement non linéaire en fonction du vieillissement. Une définition générale plus précise de plages de référence normale est difficile en raison de la dispersion des résultats obtenus avec différentes méthodes.

#### **2.4.2.5 Evaluation par mesure de l'activité neuronale sympathique musculaire (ASNM)**

La mesure de l'ASNM est effectuée par l'enregistrement d'une séquence de salves (bursts) en synchronisme avec le cycle cardiaque. L'ASNM peut être mesurée à partir du nerf sciatique poplité externe par micro neurographie. Les salves sont intégrées par matériel ou logiciel approprié, afin d'obtenir une salve présente dans chaque battement cardiaque. La méthode la plus fréquemment utilisée pour extraire l'activité sympathique est de compter les salves, soit comme des salves / battement soit comme des salves / minute. Étant donné que le critère salves/min ne considère pas la FC, elle ne serait pas être influencée par la FC.

Plus récemment, l'analyse spectrale a été appliquée également à ces salves et des bandes spectrales similaires à celles de la variabilité de la FC ont été trouvées.

L'ASNM peut être utilisée pour mesurer la partie sympathique-vasculaire du baroréflexe [337]. Les mesures sont obtenues après des injections intraveineuses de bolus de nitroprussiate de Na ou de phényléphrine. Les médicaments vasoactifs induisent des changements de la PA qui sont modifiés par les actions de l'activité sympathique.

Des méthodes moins courantes consistent à utiliser à l'état d'équilibre des infusions de substances vasoactives pour déterminer le BRS en utilisant les variations spontanées de la PA. Les variations spontanées de repos de la PA et de l'ASNM peuvent également être quantifiées.

Une autre approche consiste à modifier directement la pression transmurale au niveau du sinus carotidien en utilisant la pression ou l'aspiration au niveau du cou.

L'ASNМ et la noradrénaline mesurées simultanément au niveau cardiaque ou rénale chez les sujets au repos sont corrélées de façon positive et significative. Il existe également une corrélation des taux plasmatiques circulants de noradrénaline et l'ASNМ au repos [338].

#### **2.4.2.6 Catécholamines**

Les taux de catécholamines dans le sang sont le résultat de la libération de NA, de sa réabsorption, de sa clairance et du débit sanguin tissulaire. Les estimations des taux de libération de NA se rapprochent de l'activité nerveuse sympathique avec plus de précision que les concentrations plasmatiques de NA dans des conditions dans lesquelles la clairance de la NA est altérée (par exemple, en cas de dysautonomie) [339]. Toutefois, la détermination du taux de libération de NA nécessite une perfusion régulière de 3-H-noradrénaline, dépend de la clairance locale [39] et se fait dans les expériences en décubitus [340]. La NAC peut être mesurée par la mesure du trop-plein synaptique en NA [341].

#### **2.4.2.7 Imagerie du SNA cardiaque. Techniques et définition des indices scintigraphiques**

Deux traceurs ont été utilisés pour caractériser le système nerveux sympathique: le [<sup>123</sup>I] – méta-iodo-benzyl-guanidine (MIBG) et le [<sup>11</sup>C]-meta-hydroxy-ephedrine (HED). Ces traceurs partagent un certain nombre de caractéristiques. Les traceurs ne sont pas métabolisés, sont stockés dans les vésicules synaptiques, repris dans les terminaisons nerveuses post-ganglionnaires sympathiques présynaptiques et recyclés en continu au niveau de la terminaison [342].

Le traceur le plus largement utilisé (> 95% des publications) est le <sup>123</sup>I -MIBG, un dérivé de la guanéthidine. Sa captation par les terminaisons neuronales peut être évaluée par la tomographie par émission de photon unique (SPECT). Dans le cœur, des images précoces et tardives sont obtenues et la captation du [<sup>123</sup>I] -MIBG est quantifiée. L'absorption myocardique locale de [<sup>123</sup>I] -MIBG est calculée, normalisée à la valeur maximale des pixels au niveau ventriculaire gauche et exprimée en pourcentage de cette valeur. L'analyse est semi-quantitative dans les différents segments cardiaques et une valeur pour l'absorption totale est calculée. Les ratio de fixation myocardique de MIBG dans différents segments du myocarde [343] comme, les ratio cœur / médiastin (Heart / Mediastin) ou cœur / foie (Heart / Liver) sont

souvent calculés. Un taux de lavage (wash-out) dans l'ensemble myocarde est également obtenu.

Le [ $^{11}\text{C}$ ]-HED a été beaucoup moins utilisé que le [ $^{123}\text{I}$ ]-MIBG. Comme pour le MIBG, la rétention neuronale nécessite un stockage vésiculaire intact. La rétention tissulaire du HED est également sensible aux variations des taux de NA synaptiques et du tonus sympathique. Dans le cœur humain transplanté, des études utilisant du [ $^{11}\text{C}$ ]-HED ont démontré une meilleure rétention du traceur dans la paroi antérieure proximale en corrélation avec la présence d'axones sur l'évaluation histologique [344], une augmentation de la perfusion myocardique après l'activation sympathique confirmant ainsi la spécificité neuronale de HED-PET et sa capacité à évaluer l'intégrité du nerf sympathique présynaptique. L'hétérogénéité de la captation de la région ventriculaire gauche [ $^{11}\text{C}$ ]-HED est comparée à une base de données de valeurs normales non diabétiques. Quand les valeurs dépassent une valeur de seuil prédéfinie, le résultat est considéré comme étant anormal. Une hétérogénéité accrue a été proposée comme un reflet de la dénervation de ventricule gauche [345]. Un avantage de cette technique proposée par rapport à celle utilisant le MIBG est que les modifications de rétention régionale absolue peut être quantifiée par le calcul d'un "indice de rétention" [346], qui corrige la rétention de traceur pour la le traceur myocardique.

Peu d'études ont abordé la reproductibilité des techniques scintigraphiques. Le coefficient de variation pour l'analyse MIBG chez les sujets atteints de diabète a été estimée à 4% [347]. Chez les sujets atteints de DT1, des [ $^{11}\text{C}$ ]-HED scans ont été effectuées à 7-8 jours d'intervalle. La moyenne de l'indice de rétention (en ml de sang / min / ml de tissue) pour ces études était de 0,008 [348]. Si on considère la scintigraphie [ $^{11}\text{C}$ ]-HED comme test de référence pour dépister une NACclinique, la spécificité est de 0,86 et la sensibilité de 0,67 [345].

### **2.4.3 Données chez les diabétiques**

#### **2.4.3.1 Variabilité de la FC et diabète**

Un grand nombre des publications ont utilisé les index issus des variabilités de FC et de l'analyse spectrale dans le diabète. En résumé, le résultat le plus commun est une réduction de la variabilité globale de la FC (un signe de dysfonctionnement parasympathique) et une réduction spécifique de la composante respiratoire de la variabilité de la FC [323]. Dans la neuropathie diabétique, en appliquant cette technique à la fois en position couchée et debout, on peut observer le changement (ou plutôt l'absence de changement) dans la modulation du système sympathico-vagal cardiaque [349].

Une étude a suggéré que l'activation sympathique est un lien entre la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'HTA chez des descendants de diabétiques de type 2 explorés par clamp euglycémique – hyperinsulinémique. Les descendants insulino-résistants présentaient une réponse sympathique plus ample par rapport aux contrôles qui n'avaient pas d'antécédents de diabète chez leurs parents, suggérant et que les descendants des diabétiques insulino-résistants ont une activité sympathique élevée et que l'insulino-résistance est une étape précoce pour l'apparition de cette anomalie [350]. Des résultats identiques ont été retrouvés par une autre équipe, avec un lien plus marqué pour le sexe masculin que pour le sexe féminin [351].

#### **2.4.3.2 Précision diagnostique de la mesure de la sensibilité du baroréflexe (BRS) chez les patients atteints de diabète.**

Deux études avaient comme but d'évaluer la précision diagnostique de la BRS pour le diagnostic de la neuropathie cardiaque en comparaison avec les tests de référence. Chez 108 patients avec DT1, les auteurs ont trouvé une précision de la sensibilité du BRS faible à modérée pour la distinction entre les patients avec ou sans neuropathie autonome cardiaque (NAC) et les témoins (aire sous la courbe (AUC) de 0,63 - 0,88 NAC vs Contrôles, 0,53 - 0,70 sans NAC vs Témoins) [352, 353].

Une autre étude n'a pas trouvé chez 53 patients avec DT2 une meilleure sensibilité de la BRS par rapport aux tests de référence (sensibilité de 37% pour la NAC, sensibilité de 83% pour NAC sévère). La plupart des études ont rapporté des valeurs moyennes des indices de BRS inférieures chez les patients avec NAC comparés à des sujets témoins sains [352, 353]



### **2.4.3.3 Diabète et mesures d'activité neuronale sympathique musculaire (ASNM)**

Les résultats d'études chez les patients diabétiques dans le cadre de la neuropathie autonome suggèrent un comportement différent dans le DT1 et le DT2. Deux études menées chez des DT1 ont montré une réponse atténuée de l'ASNM suite à une HGPO ou lors d'un clamp hyperinsulinémique [354, 355]. Une étude a démontré chez les patients DT2 une activité sympathique de l'ASNM élevée [356]. Le défaut de ces études est le relativement faible nombre d'observations et le fait que cette méthode est beaucoup mieux adaptée à la mesure des changements dynamiques du tonus sympathique plutôt que sa valeur "de repos", principalement en raison des difficultés techniques liées à l'obtention d'un enregistrement de base reproductible.

### **2.4.3.4 Diabète et dosage des catécholamines**

#### **2.4.3.4.1 *Changements de posture***

Les catécholamines plasmatiques ont été étudiées dans de nombreuses expériences dans l'hypotension orthostatique diabétique. Les concentrations au repos en position couchée sont normales ou basses, avec une augmentation qui reste inférieure à la normale lors d'un test d'orthostatisme dans l'hypotension orthostatique diabétique par exemple [357, 358]. Survenant relativement tard au cours de la maladie, l'hypotension orthostatique et les réponses NA atténuées ne se trouvent que chez les patients avec des lésions généralisées au niveau du système sympathique. En conséquence, l'évaluation des catécholamines est un marqueur peu sensible pour la détection de la neuropathie sympathique.

#### **2.4.3.4.2 *Exercice***

L'exercice provoque une augmentation rapide dans le plasma des concentrations de NA. Chez les sujets diabétiques atteints d'une neuropathie diabétique, il existe une sécrétion atténuée des catécholamines. L'interprétation de taux de NA plasmatiques en même temps que les données de l'exercice nécessite la détermination de la captation d'oxygène [359], ce qui fait de cette technique plus un outil de recherche plutôt que d'un outil diagnostique.

#### **2.4.3.4.3**     *Hypoglycémie*

L'adrénaline plasmatique augmente jusqu'à 100 fois au cours de l'hypoglycémie chez les sujets sains. Plusieurs études ont étudié l'influence de la neuropathie diabétique sur les concentrations plasmatiques de l'adrénaline lors de l'hypoglycémie, avec une réduction des réponses plasmatiques d'adrénaline à l'hypoglycémie probablement due à une neuropathie sympathique affectant les fibres préganglionnaires de la médullosurrénale [360]. Cependant, les antécédents d'hypoglycémie affecte aussi profondément la réponse d'adrénaline à l'hypoglycémie, ce qui rend l'interprétation des données difficiles en l'absence de normalisation stricte de contrôle métabolique [361]. Ainsi, la réponse des catécholamines à l'hypoglycémie ne convient pas comme un test de routine pour la neuropathie sympathique.

#### **2.4.3.4.4**     *Poignée soutenue (sustained handgrip)*

La poignée serrée soutenue « handgrip » repose sur la réalisation d'une contraction isométrique de la main à l'aide d'un dynamomètre après avoir déterminé la contraction maximale que peut effectuer le sujet. Elle induit une augmentation de 3 à 5 fois des concentrations plasmatiques de noradrénaline chez les sujets sains. Une diminution de la réponse à la poignée soutenue a été signalée dans plusieurs maladies neurologiques, [362]. La variation à la fois intra et inter individuelle de la noradrénaline est considérable [363]. Les études sur la neuropathie diabétique qui mesurent les réponses de noradrénaline représentent essentiellement l'activité sympathique.

#### **2.4.3.4.5**     *Test au froid, manœuvre de Valsalva et stress mental*

Le test au froid, le stress mental et la manœuvre de Valsalva doublent les concentrations plasmatiques de noradrénaline. Des réponses faibles ont été identifiées chez des patients diabétiques atteints de neuropathie sévère en ce qui concerne la noradrénaline [364]. De même, le stress induit une augmentation significative des catécholamines (principalement l'adrénaline), avec des réponses qui sont atténuées dans la neuropathie diabétique. La littérature est rare et la puissance de diagnostic des mesures de catécholamines dans ces conditions expérimentales n'est pas claire.

### 2.4.3.5 Applications de la neuroimagerie dans le diabète

De nombreuses études transversales ont comparé la capacité de [<sup>123</sup>I]-MIBG et [<sup>11</sup>C]-HED pour détecter la dénervation sympathique cardiaque par rapport aux tests de la variabilité de la FC conventionnelle. Chez 42 sujets DT2, la scintigraphie myocardique au [<sup>123</sup>I]-MIBG a été comparée à l'analyse de la puissance spectrale [56]. Lors des images tardives, la captation et le lavage de [<sup>123</sup>I]-MIBG étaient significativement plus faibles chez les sujets ayant une NAC basée sur des tests de variabilité de la FC. C'est l'image tardive de [<sup>123</sup>I]-MIBG qui a montré la plus forte corrélation avec la puissance spectrale ( $r = 0,55$ ,  $p < 0,01$ ) [365]. Dans une étude transversale chez 24 sujets atteints de DT1 sans maladie coronarienne et 10 sujets sains contrôle, la capacité de l' [<sup>123</sup>I]-MIBG pour détecter la NAC a été comparée avec les tests de variabilité de la FC. Seuls 6 sujets avaient des images normales. Parmi les 18 sujets présentant des déficits de captation de [<sup>123</sup>I]-MIBG, seulement 7 ont présenté des tests anormaux de la variabilité de la FC ( $p < 0,01$ ) [343].

Les déficits de la captation de [<sup>123</sup>I]-MIBG sont compatibles avec un dysfonctionnement neuronal aigu chez les DT1 et sont atténués par une insulinothérapie intensive [366]. Les études observationnelles prospectives à plus long terme ont utilisé des techniques scintigraphiques pour explorer les effets du contrôle métabolique sur la dénervation cardiaque. Dans une étude de 3 ans utilisant [<sup>11</sup>C]-HED chez des sujets atteints de DT1, l'amélioration du contrôle glycémique a entraîné une réduction significative de l'ampleur des déficits de rétention du traceur. Cette amélioration contrastait avec la progression des défauts dans le groupe de sujets ayant un mauvais contrôle métabolique [348]. Il y a peu d'informations sur la capacité des interventions autres que le contrôle de la glycémie pour affecter la rétention du traceur de scintigraphie.

### 2.4.3.6 Diabète et manifestations cliniques de la NAC

#### 2.4.3.6.1 *Épidémiologie de la NAC*

L'évaluation la plus souvent utilisée est la présence ou non d'une NAC selon les tests d'Ewing. Peu d'information existe quant à la fréquence de la NAC dans les populations diabétiques. Les différences de méthodologie utilisée expliquent également une prévalence qui varie entre 1% à 90%. La prévalence de la NAC augmente avec l'âge, la durée du diabète et un mauvais contrôle glycémique. L'âge, le diabète, l'obésité et le tabagisme sont des facteurs de risque de réduction de la variabilité de la FC dans le DT2.

#### **2.4.3.6.2**     *NAC et paramètres métaboliques*

L'identification de facteurs précoces de prédiction de troubles métaboliques est essentielle pour rendre efficace la prévention primaire. Dans un article récent, la contribution des deux mesures de déséquilibre autonome, la FC au repos et la variabilité de la FC a été examinée sur une cohorte de population générale. Le risque de développement des paramètres du syndrome métabolique (hyperglycémie, HTA, triglycérides, HDL-cholestérol et IMC) a été évalué après un suivi de 12 ans. La variabilité de FC et la FC au repos, l'âge et le tabac étaient des facteurs prédictifs d'une PA haute, d'une hyperglycémie et du diagnostic d'un diabète [367]. L'obésité et l'insulinorésistance peuvent modifier la réponse sympathique postprandiale, les sujets insulinorésistants atteints d'un syndrome métabolique ont une réponse sympathique au glucose par voie orale atténuée par rapport aux sujets avec le syndrome métabolique qui sont insulinosensibles. Cette réponse est liée à l'adiposité centrale et la réponse à l'insuline, mais sans différence dans la vasodilatation musculaire ou les baroréflexes [368].

#### **2.4.3.6.3**     *Tachycardie de repos*

Chez les patients diabétiques ayant une inhibition vagale, la FC de repos est de 90 à 100 bpm et peut monter jusqu'à 130 bpm.

#### **2.4.3.6.4**     *Intolérance à l'activité physique*

La dysautonomie altère la tolérance à l'exercice, réduit la réponse de la FC et de la PA et diminue l'augmentation du débit cardiaque en réponse à l'exercice.

#### **2.4.3.6.5**     *Hypotension orthostatique*

L'hypotension orthostatique peut provoquer des symptômes comme faiblesse, des étourdissements, des vertiges, des troubles visuels, et même une syncope après un changement de la position couchée à la position debout. L'hypotension orthostatique peut devenir invalidante, mais la chute de la PA peut également être asymptomatique [369].

#### **2.4.3.6.6**     *Syndrome de tachycardie ou bradycardie après l'orthostatisme*

Les symptômes compatibles avec l'orthostatisme, tels que le sentiment de faiblesse, paresthésie péri-buccale et des maux de tête, peuvent se produire lors du changement de la position couchée à la position debout et peuvent être causés par le syndrome postural de tachycardie, avec une tachycardie sinusale inapproprié, une vraie syncope

neurocardiogénique ou des anomalies en fonction de barorécepteur. La caractéristique de ces anomalies est l'absence d'une chute de la PA avec l'orthostatisme, mais la présence d'une tachycardie ou bradycardie lors du changement de posture. Sa pathogénie reste obscure.

## **2.4.4 Pronostic cardiovasculaire**

### **2.4.4.1 FC, variabilité de la FC et risque de mortalité**

La FC au repos et la variabilité de FC sur une cohorte issue de la population générale suivie pendant 12 ans était un facteur de prédiction de maladies cardiovasculaires et de la mortalité précoce [367].

#### **2.4.4.2 A SNM et insuffisance cardiaque**

Une seule étude prospective a évalué le rôle pronostique de l'ASNM chez les patients insuffisants cardiaques chroniques, montrant que seule l'ASNM et la circulation sanguine de l'avant-bras étaient des prédicteurs significatifs indépendants de la mortalité, en analyse multivariée [370].

#### **2.4.4.3 Imagerie du SNA cardiaque et pronostic cardiovasculaire**

La captation de [<sup>123</sup>I]-MIBG est réduite dans la partie inférieure et postérieure du ventricule gauche chez les sujets qui présentent une ischémie myocardique silencieuse [371] ou symptomatique [372]. La scintigraphie a été utilisée pour explorer les relations du myocarde et du débit sanguin avec l'innervation de type 1 chez les sujets diabétiques. La réduction de la réserve du flux sanguin myocardique est associée au contrôle glycémique [373].

#### **2.4.4.4 NAC et ischémie myocardique et risque de mortalité**

La présence d'une NAC réduit l'appréciation de la douleur ischémique ce qui retarde le diagnostic de l'ischémie ou infarctus du myocarde.

Dans 15 études dans lesquelles l'évaluation de base pour la fonction autonome cardiovasculaire a été faite sur la base de au moins un ou plus des tests décrits par Ewing, les taux de mortalité totale étaient plus élevés chez les sujets avec NAC. L'estimation du risque relatif sur 15 études, sur un total de 2900 sujets qui ont eu 1 ou plusieurs tests positifs selon

Ewing, était de 2,14, avec un intervalle de confiance de 95% de 1,83 à 2,51 ( $P < 0,0001$ ). Si la NAC est défini par la présence de 2 tests anormaux, le risque augmente à 3,65 (intervalle de confiance de 95%, 2,66 à 4,47).

Les mécanismes par lesquels la NAC entraîne une augmentation de la mortalité restent obscurs. La NAC est considérée comme une cause potentielle du mort subite. La présence d'une variabilité cardiaque diminuée et d'une prolongation du QT sont les mécanismes proposés afin d'expliquer cette association [374]. Les patients peuvent avoir un intervalle QT long ce qui a conduit à la spéculation que la NAC pourrait prédisposer à des arythmies ventriculaires malignes et à la mort subite par arrêt cardiaque causé par des torsades de pointes.

D'autre part, on note une association entre NAC et plusieurs pathologies comme la coronaropathie et l'insuffisance rénale. Cependant, le risque relatif diminue de 4,03 à 1,39 après ajustement sur la durée du diabète, la maladie rénale, l'HTA et les maladies cardiovasculaires, mais il reste significatif [323].

#### **2.4.4.5 NAC et événements cardiovasculaires**

La NAC est associée à 2,2 à 3,4 fois plus d'événements cardiovasculaires majeurs, comme l'incidence d'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, la réanimation de tachycardie ou de fibrillation ventriculaire, l'angine de poitrine ou le besoin de revascularisation coronaire [375, 376].

La présence de la NAC est associée à la mortalité après infarctus du myocarde : un test au chevet du patient qui mesurait pendant 1 minute sa variabilité de FC pendant une respiration profonde prédisait la mortalité toutes causes confondues pour 185 patients (17,8%) après un premier infarctus [377].

#### **2.4.4.6 NAC et insuffisance cardiaque**

La présence d'une NAC est associée à des anomalies de la fonction systolique et diastolique du ventricule gauche, particulièrement en l'absence de la maladie cardiaque chez les patients diabétiques [378].

#### **2.4.4.7 NAC et rigidité artérielle**

Chez les DT1 ayant une activité vagale basse, la variabilité de FC est associée à une diminution de la distensibilité de l'artère brachiale et une augmentation de la rigidité artérielle (augmentation de la VOP et de l' $A_{Ix@75}$ ). Après ajustement pour les facteurs

cardiovasculaires, les associations restaient significatives pour la VOP et la distensibilité de l'artère brachiale [2].

#### **2.4.4.8 NAC et instabilité cardiovasculaire per- et péri-opératoire**

La morbidité cardiovasculaire et la mortalité périopératoire sont augmentées de 2 à 3 fois chez les patients atteints de diabète. Par rapport aux sujets non diabétiques, les patients diabétiques subissant une anesthésie générale peuvent avoir une diminution de la FC et de PA pendant l'induction de l'anesthésie et après l'intubation trachéale et l'extubation. L'utilisation des vasopresseurs est plus souvent nécessaire chez les personnes diabétiques avec NAC que chez ceux qui sont indemnes [379].

## 2.4.5 Résumé

- ❖ Le SNA régule des fonctions qui échappent au contrôle volontaire, comme la régulation du système cardio-vasculaire. En raison de la double innervation cardiaque, on conçoit que les résultats des épreuves autonomiques reflètent une réduction de l'activité parasympathique ou une augmentation de l'activité sympathique ou inversement
- ❖ Le SNA est responsable pour l'arythmie respiratoire sinusale, la régulation à court terme de la PA et les baroréflexes.
- ❖ L'arythmie respiratoire sinusale (ARS) représente la fluctuation au cours du cycle respiratoire de la FC de battement à battement et agit afin d'amortir les fluctuations de la PA et de coordonner la perfusion et la ventilation pulmonaire en augmentant l'oxygénation.
- ❖ Dans les conditions physiologiques, la régulation à court terme de la PA est essentiellement sous la dépendance de deux arcs réflexes inhibiteurs : le premier est lié au système à haute pression et le deuxième au système à basse pression.
- ❖ Le contrôle baroréflexe est fondamental dans l'adaptation hémodynamique au changement de posture.
- ❖ Le SNA régule également la fonction sécrétoire gastrointestinale (sécrétion salivaire, gastrique ou pancréatique) la digestion et l'absorption et le transport des résidus.
- ❖ Les explorations cliniques cardiovasculaires du SNA reposent sur les épreuves de respiration profonde, l'épreuve d'orthostatisme et l'épreuve de Valsalva, qu'on doit interpréter en fonction de l'âge. D'autres tests comme l'hypotension orthostatique et l'épreuve «handgrip» sont également utilisés.
- ❖ La variabilité de la FC suite à une analyse spectrale après un enregistrement ECG doit être mesurée par un enregistrement pendant une respiration rythmée et la PA avec chaque battement. Elle fournit des informations importantes à propos de la modulation autonome du système cardio-vasculaire et peut être identifiée par la mesure des domaines temporels et fréquentiels. La partie des hautes fréquences du spectre (fréquences de 0,15 à 0,40 Hz) représente l'activité vagale et le rapport LF/HF la balance sympathico-vagale.
- ❖ L'analyse spectrale de la PAS mesure l'activation sympathique qui se produit à des fréquences comprises entre 0,075 et 0,15 Hz chez l'homme.
- ❖ Le baroréflexe cardio-vagal peut être estimé par différentes méthodes consistant à mesurer la variation de la FC (intervalle RR) en réponse à un changement de PAS.
- ❖ L'ASNM peut être utilisée pour mesurer la partie sympathique-vasculaire du baroréflexe.



- ❖ Une autre mesure de l'activité du SNA est les taux de catécholamines suite à des manœuvres cliniques.
- ❖ L'imagerie par la captation de deux traceurs le [<sup>123</sup>I] – méta-iodo-benzyl-guanidine (MIBG) et le [<sup>11</sup>C]-meta-hydroxy-ephedrine (HED) est aussi utilisée pour mesurer l'activité autonome cardiaque.
- ❖ Le diabète diminue la variabilité de la FC, l'activité neuronale sympathique musculaire et les taux des catécholamines.
- ❖ La présence d'une NAC chez les patients diabétiques est associée à une tachycardie de repos, intolérance à l'activité physique et hypotension orthostatique.
- ❖ Les conséquences de la NAC en dehors des manifestations cliniques sont plus importantes vu qu'elle entraîne une augmentation de la mortalité et est considérée comme une cause potentielle du mort subite.
- ❖ La NAC est associée à 2,2 à 3,4 fois plus d'événements cardiovasculaires majeurs.
- ❖ L'association de la NAC avec l'augmentation de la rigidité artérielle (augmentation de la VOP et de l'Aix@75). [2] n'a pas été retrouvé dans nos travaux (cf Résultats: Neuropathie et rigidité artérielle).

## 2.5 Facteurs déterminants du débit cardiaque

### 2.5.1 Physiologie

Le débit cardiaque [l/min] est la quantité de sang qui circule par minute dans tout le système cardio-vasculaire.

Le volume d'éjection est la quantité de sang [ml] que le ventricule gauche éjecte à chaque battement de coeur dans l'aorte. Le schéma ci dessous montre que le volume d'éjection est d'autant plus élevé que la contractilité myocardique et le retour veineux sont importants, et que les résistances périphériques sont moindres.

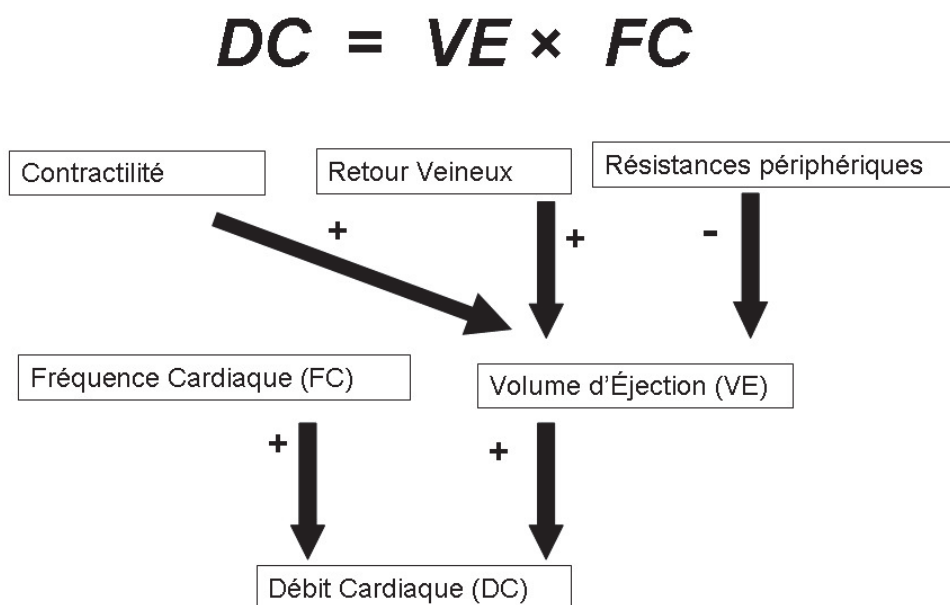


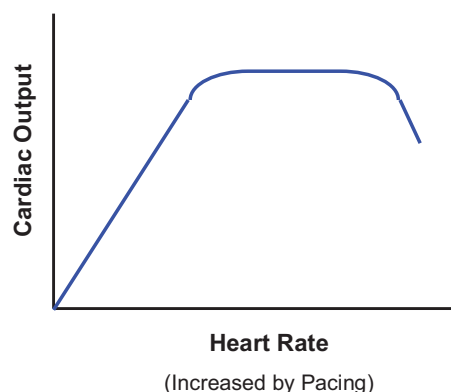
Figure 10: Relation entre le débit cardiaque et ses déterminants

### 2.5.2 Rôle prépondérant de la FC

Les changements du FC ont un effet plus important sur les changements du débit cardiaque par rapport aux variations du débit du volume d'éjection (**Figure 10**).

Les variations de la FC sont inversement corrélées au volume d'éjection. Quand la FC est basse, l'augmentation de la FC est supérieure à la diminution du volume d'éjection. Quand la FC est élevée, la diminution du volume d'éjection est supérieure à l'augmentation de la FC (diminution du temps de remplissage).

## Effects of Heart Rate on Cardiac Output



**Figure 11:** *Effets des variations de la FC et débit Cardiaque*

Une augmentation de la FC provoque un effet inotrope positive (effet Bowditch, phénomène de Treppe) via le SNA (cf la partie dédiée au SNA) (**Tableau 13:** *Effets du SNA sur le coeur*).

Effet	Sympathique	Parasympathique
Chronotrope (FC)	+++	---
Inotrope (Contractilité)	+++	-
Dromotrope (Vitesse de conduction)	++	---

**Tableau 13:** *Effets du SNA sur le coeur.*

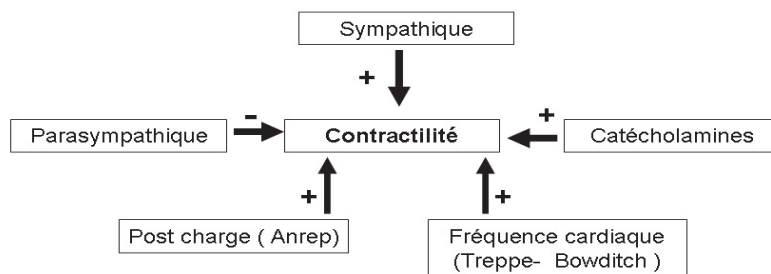
La noradrénaline est libérée des terminaisons nerveuses sympathiques et se lie aux récepteurs adrénergiques post synaptiques (ordre d'importance fonctionnelle:  $\beta_1 > \beta_2 > \alpha_1$ ) afin d'augmenter l'action positive (+) inotrope, chronotrope et dromotrope. Les récepteurs  $\alpha_2$  - adrénergiques présynaptiques servent comme un mécanisme de rétrocontrôle pour inhiber la libération de noradrénaline. Les nerfs parasympathiques (vagues) libèrent l'Ach, qui se lie à des récepteurs M2 postsynaptiques pour diminuer (-) l'effet inotrope, chronotrope et dromotrope. L'Ach se lie également aux récepteurs présynaptiques muscariniques (M2) sur les terminaisons nerveuses sympathiques pour inhiber la libération de noradrénaline.

La FC maximale au cours d'un test d'effort maximal dépend de la fonction du sinus cardiaque et de l'innervation sympathique cardiaque [381]. Après arrêt de l'exercice, la récupération de la FC est médiée par l'activation vagale et la récupération ultérieure du tonus vagal et l'inhibition du sympathique [382]. Le défaut chronotrope chez les greffés cardiaques a été expliquée par la dénervation sympathique cardiaque et l'absence de libération locale de NE ; l'augmentation de la FC chez ces patients pendant l'exercice dépend des catécholamines circulantes à la phase précoce de leur période post opératoire.

### 2.5.3 Déterminants de la contractilité

En termes simples, la postcharge est étroitement liée à la PA aortique et aux résistances périphériques. L'augmentation de la FC et du SNA sympathique provoque un effet inotrope positive (phénomène de Treppe). Une augmentation brusque de la postcharge peut provoquer une augmentation inotrope modeste. Ce phénomène s'appelle l'effet Anrep et son mécanisme n'est pas bien compris.

#### Facteurs qui modifient la contractilité



**Figure 12: Facteurs déterminants de la contractilité cardiaque**  
D'après [380].

### 2.5.4 Déterminants de la FC intrinsèque chez l'homme

En 1970, Jose et Collison ont publié une étude sur la FC normale et les déterminants de la FC intrinsèque de l'homme [383]. La FC intrinsèque était définie comme la FC lors de l'inhibition simultanée des récepteurs  $\beta$  adrénergiques par le propranolol (0,2 mg/kg) et des récepteurs muscariniques (0,04 mg/kg) par l'atropine antagoniste. La FC est en moyenne dans les 2 sexes

de 107 battements/min à 20 ans et diminue à 90 battements/min à 50 ans. L'intérêt de ce concept pharmacologique a cependant ses limites, le propranolol n'interfère que partiellement avec l'activité de la branche sympathique du SNA, car il bloque les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, mais pas les  $\alpha$ -adrénergiques [384].

### 2.5.5 Mesure du débit cardiaque avec l'utilisation de l'impédance cardiaque

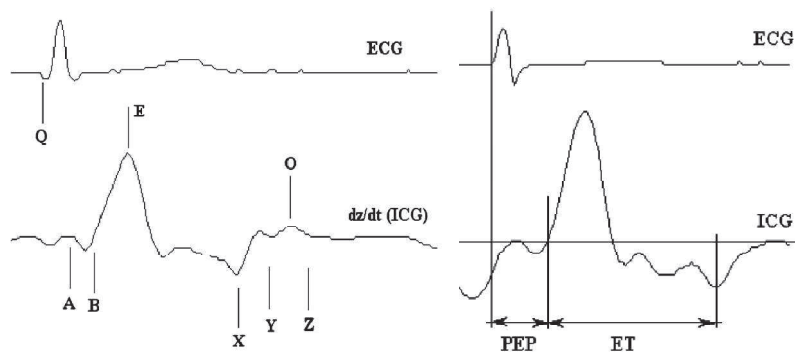
La méthode est basée sur les variations de la résistance électrique au niveau de la poitrine au cours des battements cardiaques. Les modifications qui se produisent comme l'augmentation du volume de l'aorte, du volume sanguin pulmonaire et du flux sanguin des gros vaisseaux vont influencer le signal d'impédance. Avec les fréquences électriques actuelles utilisées dans l'impédance cardiaque (10 kHz à 100 kHz), les érythrocytes, en général, ne sont pas responsables de la production d'un courant électrique. Au repos, les mouvements browniens ont une orientation aléatoire. Dans les nouveaux systèmes d'impédance, huit électrodes sont utilisées (quatre électrodes qui fournissent le courant électrique, connues sous le nom "d'électrodes de courant", et quatre électrodes qui enregistrent les variations de tension, "les électrodes de tension").

Les électrodes sont positionnées de manière symétrique des deux côtés du cou du patient (électrodes de courant au-dessus des électrodes de tension) et des deux côtés de la poitrine au croisement de la ligne mi-axillaire et de l'appendice xyphoïde (électrodes de courant au-dessous des électrodes de tension). En raison de la loi d'Ohm, lorsque le courant d'intensité constante circule à travers la poitrine, les variations de tension sont directement proportionnelles à l'évolution de la résistance. L'ensemble de la résistance de la poitrine, connu sous le nom de résistance de base ( $Z_0$ ), est la somme de la résistance de chacun des composants de la poitrine : le tissu adipeux, les muscles cardiaques et squelettiques, les poumons, les vaisseaux, les os et l'air. Les variations de la résistance de la poitrine résultent des changements du volume des poumons au cours de la respiration et des changements de volume et de vitesse du sang dans les gros vaisseaux pendant la systole et la diastole. Les variations de la résistance causées par la respiration sont éliminées par l'utilisation de filtres électroniques et les variations de la résistance associées au flux sanguin sont prises en considération.

Sur le graphique (**Figure 13**) de la première dérivée des changements d'impédance, les vagues suivantes sont distinguées : A, B, E, X, Y, O. La vague A apparaît entre le début de l'onde P et du début du complexe QRS et est liée aux changements de la volémie pendant la contraction auriculaire. Ensuite vient l'onde B, qui apparaît en même temps que l'ouverture de la valve aortique. La prochaine onde correspond au flux aortique s'appelle  $DZ/Dt$  et E correspond à

son pic maximum, reflétant la rapidité des variations du flux sanguin à travers la valve aortique pendant la systole du ventricule gauche. Il a été constaté, cependant, que l'onde  $DZ/Dt$  est également causée par des changements dans la circulation de l'artère pulmonaire au cours de la systole du ventricule droit.

L'onde  $DZ/Dt$  se termine par l'onde d'X, qui coïncide avec le deuxième bruit cardiaque et la fermeture de la valve aortique. Le signal  $DZ / Dt$  est utilisé pour la détection du temps d'éjection du ventricule gauche et pour le calcul du volume d'éjection (cf chapitre 5.1.2). La vague O correspond avec le remplissage ventriculaire et l'onde Y correspond à la clôture de la valve pulmonaire [385] (**Figure 13**).



**Figure 13:** Le signal d'impédance cardiaque (ICG).

Le débit cardiaque [l/min] est représenté par la quantité de sang mesurée qui circule par minute dans le système cardio-vasculaire. Les variables mesurées avec l'ICG seront décrites dans la partie annexe (cf chapitre 5.1.2)

## **2.6 Les modifications post prandiales : un modèle intégrant le tube digestif, les signaux hormonaux et la réponse cardiovasculaire.**

### **2.6.1 Physiologie**

#### **2.6.1.1 Fonction gastro-intestinale postprandiale**

Avaler la nourriture implique la mastication, le transfert du bolus de la cavité buccale au pharynx, l'éjection du bolus dans le sphincter œsophagien supérieur grâce à une relaxation de ce dernier, le sphincter œsophagien inférieur va rester ouvert pour une période de 8 secondes environ. Ce temps est nécessaire pour que le bol traverse l'ensemble de l'œsophage. Ensuite, le sphincter va se contracter pour empêcher le reflux gastro-œsophagien. Le contrôle neural extrinsèque de l'œsophage est fait par les voies efférentes dans le nerf glossopharyngien (œsophage supérieur) et les nerfs vagues.

Les fonctions motrices de l'estomac et l'intestin grêle diffèrent entre la période de jeûne et la période postprandiale :

- Au cours du jeûne, les événements moteurs cycliques balayent l'estomac et l'intestin grêle et sont associées à la sécrétion pancréato-biliaire. L'activité motrice cyclique est appelée le complexe moteur migrant interdigestif. Elle consiste en une phase I de quiescence, une phase II d'activité irrégulière et une phase III d'activité régulière lorsque les contractions de la fréquence maximale typiques de chaque région (3 par minute dans l'estomac, 12 par minute dans l'intestin grêle) vont balayer l'intestin pour le transport de résidus non digérés, les produits de la digestion et les débris de l'épithélium vers le côlon pour leur excrétion. Les fonctions pacemaker, l'activité motrice cyclique, et le péristaltisme sont essentiellement contrôlés par le système nerveux intrinsèque, mais peuvent être modulés par les nerfs extrinsèques.

- En période postprandiale, cette activité cyclique est abolie et les différentes régions de l'intestin utilisent des fonctions spécifiques. Les contractions toniques du fond gastrique vont vider l'estomac de liquides ; les contractions antrales tamisent et triturent la nourriture solide et propulsent des particules de moins de 2 mm à travers le pylore. Les contractions irrégulières dans la période postprandiale servent à mélanger la nourriture avec les sucs digestifs dans le duodénum et le jéjunum et à la propulser.

- La durée du transit dans l'intestin grêle est d'environ 3 heures. L'iléon est un site de stockage temporaire de chyme, afin de récupérer les éléments nutritifs et d'électrolytes liquides qui n'ont pas été absorbés en amont. Les résidus sont finalement expulsés de l'iléon pour atteindre

le côlon, grâce aux transferts de bolus qui résultent probablement par les contractions d'une activité prolongée ou par le complexe moteur migrant interdigestif.

Le nerf vague est extrêmement important dans la phase postprandiale. Les voies afférentes vagues véhiculent des signaux de l'intestin vers les ganglions prévertébraux, la moelle épinière et le cerveau pour entraîner des réponses réflexes et coordonner les fonctions sécrétoires et motrices [312].

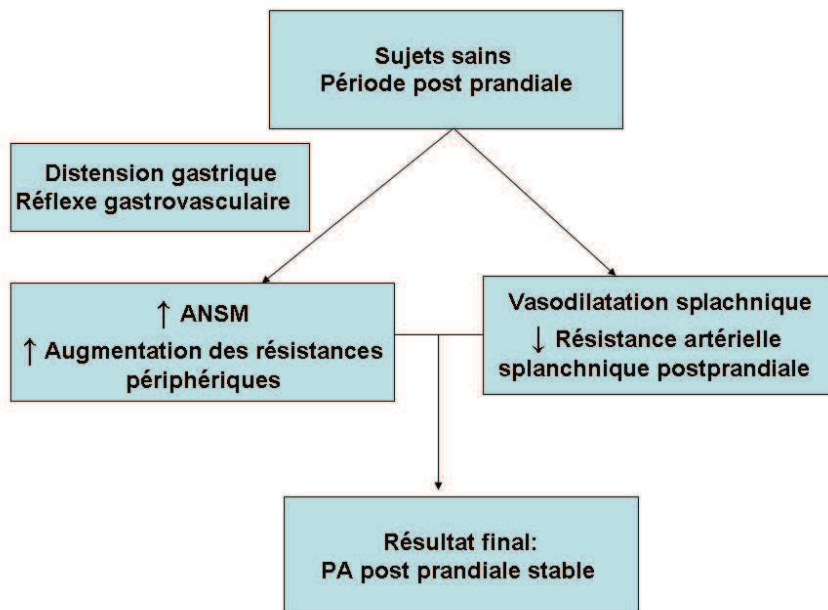
## **2.6.1.2 Modifications hémodynamiques postprandiales**

### **2.6.1.2.1 Réflexe gastrovasculaire: distension gastrique, activation sympathique post prandiale et PA**

L'augmentation de la distension gastrique proximale par étape entraîne une augmentation la PA chez les jeunes sujets sains. Ce phénomène a été nommé réflexe gastrovasculaire [386]. Afin d'évaluer l'influence de la distension gastrique sur le flux sympathique et la PA, il est possible d'enregistrer l'ASNM à partir du nerf sciatique poplité externe par micro neurographie. Dans leur travail, Rossi et al. ont montré que l'ASNM augmentait après la distension gastrique induite par un barostat (un appareil qui augmente la pression intragastrique) avec une élévation presque concomitante de la PA. L'augmentation était proportionnelle à la pression intra-gastrique et elle revenait aux valeurs initiales après la fin de distension. Ces résultats ont confirmé pour la première fois chez l'homme l'existence d'une relation fonctionnelle entre la distension gastro-intestinale et la fonction cardiovasculaire.

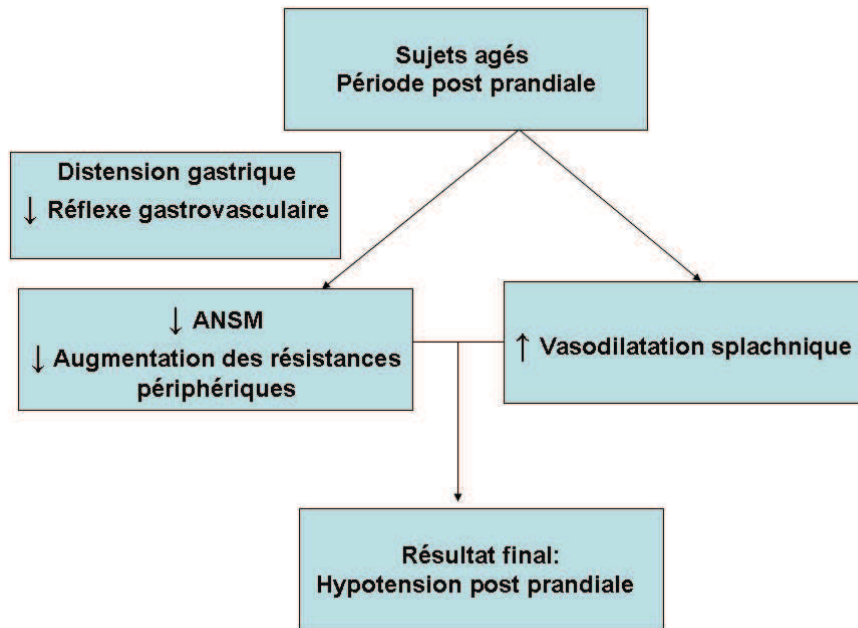
Après un repas, la résistance artérielle splanchnique diminue, ce qui devrait induire une hypotension, non observée chez les sujets jeunes en bonne santé [387]. Ceci indique que le système cardio-vasculaire est activé à un stade précoce afin d'éviter la baisse de la PA liée à la diminution de la résistance artérielle splanchnique post prandiale. Après l'ingestion des aliments, la paroi de l'estomac se relaxe et se distend sous l'effet du bol alimentaire. Ceci peut être le facteur déclenchant de l'activation du SNA. Le réflexe gastrovasculaire pourrait avoir pour but d'augmenter la résistance artérielle périphérique afin de compenser la diminution de la résistance artérielle splanchnique postprandiale.





**Figure 14:** *Activation sympathique post prandiale chez les sujets sains.*

L'augmentation de la PA est probablement ainsi une conséquence de la remise à zéro du baroréflexe provoquée par la stimulation de mécanorécepteurs dans la paroi de l'estomac [386]. Vieillir en bonne santé est associée à des changements dans la physiologie de la transformation des aliments ainsi que du contrôle de la PA. Pendant le vieillissement, il existe une diminution de la faculté de la relaxation gastrique et de l'adaptation du fundus gastrique après un repas [388, 389]. Lorsque les sujets âgés en bonne santé sont comparés à des sujets sains jeunes, on note une atténuation du réflexe gastrovasculaire, expliquée par des différences de la fonction autonome ou de la compliance gastrique. L'étirement de la paroi de l'estomac chez les jeunes sujets sains entraîne une augmentation de l'ASNM et de la PA. Pendant l'augmentation par étapes de la distension gastrique, les sujets plus âgés avaient tendance à avoir une augmentation plus importante de la PAM, de la FC et de la résistance totale artérielle périphérique. Le débit cardiaque augmentait légèrement dans les deux groupes, sans différence significative. La compliance fundique ne différait pas entre les groupes, les sujets âgés ont montré une atténuation de l'augmentation de l'ASNM par rapport aux sujets jeunes [390].



**Figure 15:** *Activation sympathique post prandiale chez les sujets âgés.*

Une action importante de la distension gastrique est d'atténuer l'effet hypotenseur provoqué par le glucose intraduodéal chez les sujets âgés sains. Lorsque le glucose est administré en intraduodéal l'administration intra-gastrique en même temps d'eau atténuait la réponse hypotensive au glucose intraduodéal, probablement en raison de la distension gastrique [391].

#### *Débit cardiaque post prandial*

Dans les premiers travaux sur le sujet, les effets hémodynamiques post prandiaux ont été étudiés avec l'utilisation d'un repas standardisé chez 80 sujets sains âgés de 19 à 31 ans. Une scintigraphie cardiaque en position couchée avant et 30 minutes après un repas (6,3 MJ) a été réalisée. Comparativement à leurs contrôles, il y avait une augmentation médiane du débit cardiaque de 62% attribuable à une augmentation de 17% de la FC et une augmentation de 41% du volume d'éjection, sans changement de la PA et ni des catécholamines plasmatiques. En effet, les volumes télodystoliques et télodiastoliques médians augmentaient tous les deux de 41%, de telle sorte que la fraction d'éjection ventriculaire gauche restait inchangée. Chez les sujets jeunes en bonne santé, la PAS ne diminue donc pas après un repas grâce au réflexe gastrovasculaire. Ce phénomène comme on a déjà vu augmente la résistance artérielle périphérique afin de compenser la diminution de la résistance artérielle splachnique post-prandiale. En dehors de l'effet mécanique du repas, son contenu peut provoquer différents types de changements hémodynamiques et l'impact de ces changements varie avec l'âge.

Par exemple, après un repas riche en graisses versus un repas riche en glucides (2,5 MJ) chez des sujets non obèses âgés de 68 ans en moyenne, le repas riche en glucides diminue la PAS avec un nadir 13 mmHg au dessous des valeurs de référence et la PAD de 8 mmHg sans changement significatif de la FC ou le débit cardiaque pendant la période expérimentale. Le flux sanguin de l'artère mésentérique supérieure augmente de 70% après le repas riche en glucides et de 42% après le repas riche en graisses. Ceci suggère que la congestion splanchnique était plus importante avec le repas riche en glucides [392]. Le repas riche en graisse n'a pas induit des modifications significatives de la PA.

#### **2.6.1.2.2     *Activation sympathique post prandiale***

L'activité du système nerveux sympathique, mesurée par les catécholamines plasmatiques, n'était pas changée, et les seuls changements volumiques ne semblaient pas expliquer la réponse hémodynamique au repas [393].

#### **2.6.1.2.3     *Hypotension postprandiale***

L'hypotension postprandiale se produit généralement chez les personnes âgées et représente une cause majeure de morbidité. Bien que la physiopathologie de l'hypotension PP reste mal comprise, divers facteurs, y compris la détérioration de la fonction sympathique, des baroréflexes, la libération de peptides vasodilatateurs, le débit des nutriments arrivant à l'intestin, la distension gastrique et la congestion splanchnique sont des éléments importants pour cette réponse. Le traitement pharmacologique actuel et la gestion non pharmacologique ne sont pas optimaux.

La mesure de la PA au moins toutes les 10 minutes pendant 60 minutes après le petit déjeuner est nécessaire pour le diagnostic de hypotension postprandiale. Elle est définie comme une chute systolique > 20 mmHg et concerne la plupart des patients. Si on change le critère pour une chute systolique > 30 mmHg, 1/3 des patients ont une hypotension postprandiale. Cependant, avec cette dernière définition, on note d'avantage de plaintes associées à l'existence de l'hypotension postprandiale [394].

Dans une étude portant sur 24 patients ayant une atrophie multisystématisée (il s'agit d'un syndrome très invalidant résultant d'une perte de neurones - maladie neurodégénérative), les patients qui présentaient une hypotension PP avaient une hypotension orthostatique plus importante et une variabilité de la FC inférieure à ceux sans hypotension postprandiale. La sécrétion postprandiale de GLP-1 était plus élevée chez les patients avec hypotension postprandiale que chez ceux sans hypotension postprandiale. Aucune différence significative n'était observée dans l'augmentation postprandiale des taux plasmatiques de glucose,

d'insuline, de noradrénaline, de neurotensine ou de GLP-2. Le traitement par Acarbose atténuait l'hypotension postprandiale et entraînait une tendance à la diminution de la sécrétion de GLP-2, une hormone augmentant la circulation intestinale [395].

#### **2.6.1.2.4      *Microcirculation***

Chez les individus sains non obèses, l'ingestion d'un repas liquide ne s'accompagne pas des changements du flux sanguin cutané.

On observe une augmentation de l'activité vasomotrice microvasculaire en relation avec la sécrétion d'insuline. Cette activité accrue est susceptible de jouer un rôle important dans la distribution du flux sanguin du muscle squelettique et, par conséquent, sur la régulation de l'insuline et la captation de glucose par le muscle squelettique.

Une telle augmentation vasomotrice suite à l'ingestion d'un repas est atténuée chez les personnes obèses, pour diverses raisons comme les variations des taux acides gras libres, d'adipokines et l'hyperactivité du système rénine angiotensine qui pourrait affecter la signalisation insulinaire et ses effets vasculaires [396].

#### **2.6.1.2.5      *Rigidité artérielle***

Il existe très peu des données sur les modifications de la VOP en post prandiale. Dans une étude récente, Taylor et al ont montré chez 19 sujets non obèses jeunes après un repas mixte (le contenu du repas n'est pas précisé dans cette publication) que la VOP a diminué de 0.4 m/sec à 60 et 180 minutes en post prandial [397]. Dans une autre étude dans une population avec les mêmes caractéristiques que l'étude précédente, il n'y avait pas de différence sur la VOP entre la période pré prandial et la période post prandiale après un repas riche en graisse [398]. Dans l'étude de Taylor et al l'Aix et l'Aix@75 diminuaient pendant la période post prandiale.

Westerbacka et al. ont montré que des doses physiologiques d'insuline pourraient diminuer de manière significative la réflexion des ondes de l'aorte chez les sujets sains avant que les effets sur le flux sanguin de l'avant-bras, les PA périphériques ou les résistances périphériques soient présents. Ces résultats suggèrent que l'insuline influence la distensibilité des grandes artères avant les artérioles [399]

Chez les sujets insulino-sensibles, la réduction post-prandiale de l'Aix est plus importante après un repas riche en hydrates de carbone qu'après un repas riche en graisses et pauvre en

hydrates de carbone. *A contrario*, chez des sujets insulino-résistants, la réponse post-prandiale de l'Aix est similaire après les deux types de repas, suggérant que la résistance à l'insuline est associée à une relaxation artérielle post-prandiale diminuée [400].

L'insuline induit une diminution de l'Aix chez les sujets sains tandis que cet effet de l'insuline est diminué chez les DT2 [257].

#### **2.6.1.2.6      *Fonction Endothéliale***

Chez l'homme sain, l'hyperglycémie aiguë par perfusion intra-artérielle de dextrose 50% dans l'artère brachiale diminue la dilatation de l'artère brachiale endothélium-dépendante induite par la métacholine, un analogue de l'Ach qui dilate normalement les vaisseaux chez des sujets euglycémiques [401].

Parmi les modifications aiguës liées à la fonction endothéliale, l'hyperglycémie post prandiale augmente les molécules d'adhésion circulantes [402], l'adhésion des monocytes sur la surface endothéliale [403] et stimule l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 [404]. Les modifications post-prandiales des concentrations de glucose, de lipides et d'insuline induisent un stress oxydant responsable de la dysfonction endothéliale [405] et induisent des changements des paramètres inflammatoires et hémostatiques [406].

Chez des sujets sains sans facteur de risque, la dilatation secondaire à l'hyperhémie post-occlusive de l'artère brachiale est déprimée après l'infusion pendant une heure d'Intralipid, qui augmente les concentrations sanguines de triglycérides et d'acides gras [407]. Une autre étude a montré que la dilatation endothélium-dépendante évaluée par l'hyperhémie post-occlusive était déprimée après un repas riche en graisses, et que cette dépression est corrélée à l'augmentation de la concentration en triglycérides [408].

#### **2.6.1.2.7      *Activation sympathique post prandiale***

##### **-Activité sympathique musculaire post prandiale**

Fagius et Berne ont contribué considérablement à la description de l'augmentation de l'ASNM en période postprandiale. L'influence de la consommation de différents nutriments sur le ASNM a été étudiée avec l'utilisation de microneurographie pendant 90 min chez 39 sujets sains non obèses normotendus (âge moyen 26 ans) qui ont reçu 100 g de glucose dans 300 ml d'eau, 50 g de graisse dans 250 ml d'eau, 100 g de viande maigre correspondant à 40 g de protéine par 250 ml d'eau, 300 ml d'eau seule ou un repas mixte (1750 kJ). Tous les types

d'aliments ont provoqué une augmentation de l'ASNM sympathique alors que l'eau n'a pas causé de changement. L'augmentation de l'ASNM était élevée dès les premières 15 à 30 min et persistait après 90 min. L'effet du glucose était significativement supérieur à celui des graisses et des protéines, le repas mixte provoquant une réponse intermédiaire. Les changements de la PA étaient mineurs. La conclusion était que l'augmentation de l'ASNM se produit régulièrement après tout type de prise alimentaire. Une augmentation de l'ASNM a lieu en l'absence d'une augmentation de l'insuline mais elle contribue à une partie seulement de la hausse après l'ingestion per os de glucose ou d'un repas mixte. On considère que cette réponse de l'ASNM est importante pour la redistribution du sang à la région splanchnique après un repas. La perte de cette réponse est susceptible d'expliquer l'hypotension postprandiale retrouvée chez les patients dysautonomiques [409] et pourrait jouer un rôle dans l'hypotension postprandiale chez les personnes âgées, comme nous l'avons vu plus haut [410].

### **-Equilibre sympatho-vagal cardiaque post-prandial**

L'équilibre sympathico-vagal postprandial a été mesuré par l'analyse spectrale de la variabilité de la FC. Neuf volontaires sains ont été inclus et un ECG a été enregistré pendant 30 min à jeun et 60 min après un repas standardisé de 500 kcals. La variabilité de la FC a été mesurée par analyse spectrale de HF, reflet de l'activité parasympathique vagale, et de l'activité LF. Il a été constaté que le rapport postprandial LF/HF, par rapport à l'état de jeûne, était augmenté de façon significative à la fois dans les 30 premières minutes et à 60 min. L'activité HF-FC postprandiale diminuait de manière significative à la fois à 30 et à 60 minutes. Ainsi, la balance sympatho-vagale postprandiale s'élevait de façon soutenue pendant 1 h, principalement en raison de la réduction de l'activité vagale [411].

### **-Effet de l'ingestion de l'eau**

Boire de l'eau augmente considérablement et rapidement l'activité sympathique. Il augmente la noradrénaline, autant que des stimuli sympathiques classiques comme la caféine et la nicotine. L'absence d'augmentation de PA chez les sujets normaux est permise par une augmentation concomitante du contrôle vagal cardiaque qui contrecarre les effets hypertenseurs de l'activation du système sympathique. On observe une bradycardie après ingestion de 500 ml d'eau par augmentation de l'activité vagale, sans changement significatif de la PA [412]. Ainsi, la perte de ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation préservée de la PA sous l'effet de l'eau chez les personnes âgées et chez les patients dysautonomiques. Boire de l'eau pourrait améliorer les symptômes dus à une hypotension orthostatique. En outre, l'effet hypertenseur de l'eau par voie orale pourrait être un facteur de confusion importante

non encore reconnue dans les études cliniques d'agents hypertenseurs et des médicaments antihypertenseurs [413].

### **-Effets des glucides sur l'ASNM**

La perfusion intraduodénale du glucose augmente l'activité du nerf sympathique chez les sujets jeunes et les sujets âgés sains. L'effet dépresseur attendu par la perfusion intraduodénale de glucose sur l'intestin grêle devrait être plus important chez les sujets âgés par rapport aux sujets jeunes, parce que l'augmentation de l'ASNM est atténuée avec l'augmentation de l'âge. Dans une étude récente, malgré la baisse de la PAS plus importante chez les sujets âgés après perfusion de glucose intra-duodéal, l'ASNM augmentait de façon similaire alors que la BRS était diminuée chez les personnes âgées. Ces données suggèrent qu'avec l'âge des modifications compensatoires complexes entrent en jeu afin d'éviter une grande variabilité hémodynamique après un repas riche en glucose. Dans une autre expérimentation, des sujets jeunes (âge moyen 26 ans) répondaient à l'ingestion de glucose par une augmentation prononcée de l'ASNM, alors qu'une réponse atténuée était observée chez les personnes âgées (70 ans), d'autant plus faibles qu'ils étaient insulino-résistants. Une relation similaire était observée au cours de la manœuvre de Valsalva, indiquant que cette atténuation de la réponse chez les personnes âgées était un phénomène généralisé. La PA restait stable chez les sujets jeunes, mais diminuait de façon significative chez les sujets âgés. La conclusion de cette expérience est que les sujets âgés utilisent leur capacité totale de l'ASNM proche du maximum au repos. Ainsi, la réserve pour la réponse à des stimuli qui induisent normalement une forte augmentation de l'ASNM est limitée [414].

### **-Effets des lipides sur l'ASNM**

La perfusion de lipides n'a pas d'effet important sur le contrôle autonome cardiovasculaire. Les sujets ont reçu une perfusion intraveineuse de solution saline avec de l'héparine comme perfusion contrôle ou une émulsion lipidique avec de l'héparine. L'héparine était perfusée chez les sujets afin d'augmenter l'activité de la lipoprotéine lipase et de faciliter la lyse des triglycérides en acides gras libres. Les résultats montraient que l'hyperlipidémie aiguë n'a pas altéré les réponses des baroréflexes et que les réponses induites par les lipides n'est pas associée à une augmentation de l'ASNM [415].

Les acides gras non estérifiés augmentent la PA via une activation sympathique centrale chez l'homme. Sur des expériences menées chez 17 volontaires sains de poids normal, le changement de la PA avec l'infusion d'une solution des lipides résulte d'une augmentation de

la résistance vasculaire systémique et de l'ASN, sans changement au cours de la perfusion de placebo. La perfusion lipidique augmente les concentrations de l'insuline, de l'aldostérone et des F2-isoprostane, isomères des prostaglandines F2 produites in vivo par peroxydation radicalaire de l'acide arachidonique, mais pas de la leptine. Ces résultats démontrent que l'activation sympathique centrale induite par les acides gras non estérifiés contribue à la réponse qui augmente la PA [416].



## 2.6.2 Hormones et SNA

### 2.6.2.1 Catécholamines et SNA

#### 2.6.2.1.1 Catécholamines et métabolisme glucidique

Les catécholamines activent les récepteurs  $\beta$  adrénergiques du foie et stimulent la production hépatique de glucose par de multiples mécanismes : la glycogénolyse et la néoglucogenèse sont augmentées, alors que la synthèse du glycogène est inhibée. Les catécholamines stimulent la libération de glucose dans la circulation sanguine et diminuent la clairance plasmatique de glucose à la fois par des mécanismes directs et indirects.

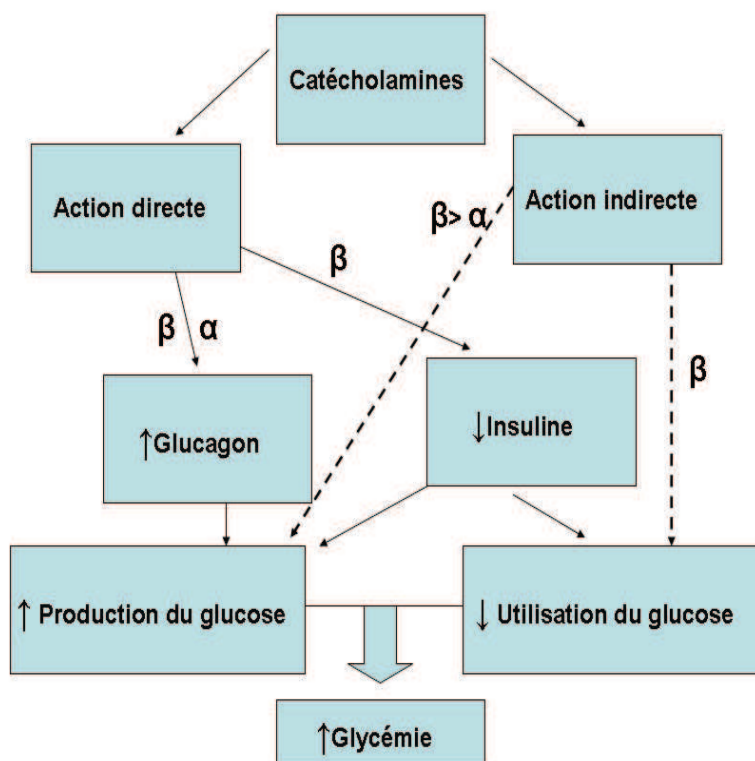


Figure 16 : Mécanismes de l'effet hyperglycémiant des catécholamines  
Modifié d'après [417]

Les catécholamines sont responsables de l'augmentation des concentrations plasmatiques de glucose. Elles permettent de contrer les hypoglycémies. Ainsi, l'activation autonome en cas d'hypoglycémie sert à la mobilisation des substrats endogènes pour la production de glucose et la normalisation de la glycémie afin que la demande du système nerveux central en glucose soit satisfaite.

Les mécanismes par lesquels le SNA agit pour corriger l'hypoglycémie sont bien établis. Néanmoins, la rétro régulation du glucose reste intacte chez les patients surrenalectomisés et chez ceux soumis à une inhibition adrénergique combinée ( $\alpha$  plus  $\beta$ ). Dans ce cas, la réponse du glucagon à l'hypoglycémie est préservée. Par conséquent, la rétro-régulation du glucose n'est pas compromise tant qu'il n'y a pas échec à la fois de la sécrétion de glucagon et des réponses adrénergiques. Le double déficit se produit généralement en cas de diabète, dans lequel un seul événement hypoglycémique peut supprimer toutes les réponses de contre-régulation à des événements hypoglycémiques ultérieurs pendant au moins 24 heures, le syndrome d'insuffisance du SNA associée à l'hypoglycémie [418].

Les patients atteints de DT1 sont particulièrement vulnérables aux hypoglycémies graves parce que la plupart d'entre eux perdent leur capacité à sécréter du glucagon au cours de la première décennie de leur maladie. Par conséquent, ils deviennent dépendants des mécanismes adrénergiques pour la contre-régulation. Ces mécanismes peuvent s'avérer insuffisants chez les patients avec une maladie de longue date et la présence d'une neuropathie autonome [417, 419].

#### **2.6.2.1.2**     *Catécholamines et tissu adipeux*

Les catécholamines agissent directement sur le tissu adipeux et stimulent la lipolyse. Ceci est un effet  $\beta_1$ -adrénergique impliquant l'activation de la triacylglycérol, lipase sensible aux hormones médiée par l'adénylcyclase. Cette enzyme clive les triglycérides dans le tissu adipeux en acides gras et glycérol. L'insuline inhibe la lipolyse induite par les catécholamines. Ainsi, l'inhibition de la sécrétion d'insuline par les catécholamines est synergique avec les effets directs des catécholamines sur le tissu adipeux.

La noradrénaline libérée localement est probablement plus importante que les catécholamines circulantes dans la régulation de la lipolyse. Cependant chez les patients présentant une acidocétose diabétique, les catécholamines circulantes deviennent suffisamment élevées localement pour stimuler à la fois la lipolyse et la cétogenèse.

#### **2.6.2.1.3**     *Catécholamines et thermogénèse*

La thermogénèse obligatoire, ou métabolisme basal, est régulée par les hormones thyroïdiennes, alors que la thermogénèse facultative (production totale de chaleur - production basale) est régulée par le système nerveux adrénergique, principalement par les récepteurs adrénergiques  $\beta_3$ . L'exposition au froid et l'exercice stimulent le système nerveux

adrénergique et ainsi augmentent la thermogénèse facultative. L'augmentation de la production de chaleur associée à la consommation alimentaire (thermogénèse postprandiale) ne peut pas être entièrement attribuée au coût de l'énergie de la digestion, l'absorption et le métabolisme des nutriments.

Ainsi, l'ingestion alimentaire active le système nerveux sympathique, stimule la thermogénèse, et cet effet peut servir à protéger contre l'obésité.

#### **2.6.2.1.4**     *Catécholamines et îlots pancréatiques*

L'adrénaline, hormone médullo-surrénalienne, et la noradrénaline, neurotransmetteur sympathique, ont de multiples effets sur le métabolisme et agissent en synergie pour mobiliser les stocks d'énergie. En plus des effets directs sur des organes cibles que nous avons vus (principalement le foie, le tissu adipeux et le muscle), les catécholamines agissent sur les îlots pancréatiques en régulant la sécrétion d'insuline et de glucagon. L'effet le plus important sur l'îlot est de supprimer la sécrétion d'insuline par les mécanismes  $\beta$  adrénergiques. Ainsi, les effets cataboliques directs de catécholamines sont amplifiés par l'inhibition de l'hormone anabolique prédominante : l'insuline.

Il existe quatre types de neurotransmetteurs parasympathiques localisés dans les îlots pancréatiques (Ach, VIP: Vasoactive intestinal peptide, PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, CGRP: Calcitonin-gene-related peptide). Ils sont libérés par l'activation du nerf vague et tous stimulent la sécrétion d'insuline et du glucagon. Ils pourraient donc tous contribuer à de la sécrétion d'insuline et de glucagon stimulée par le nerf vague. L'activation par une stimulation électrique des nerfs sympathiques sur le pancréas isolé inhibe la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose [420] et induit l'augmentation des taux de noradrénaline dans les veines pancréatiques. Le traitement avec de la noradrénaline exogène inhibe la sécrétion d'insuline [421], ce qui nous fait supposer que c'est la noradrénaline qui médie l'activation sympathique, induite par stimulation électrique. Cette hypothèse a été remise en question par des études montrant que l'inhibition des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques par phentolamine neutralise l'inhibition de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose [422]. La noradrénaline pourrait cependant stimuler la sécrétion d'insuline par deux actions différentes. Tout d'abord, à travers l'activation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques de l'îlot qui stimulent la sécrétion d'insuline [423] et par une action directe sur les cellules alpha, probablement médiée par les récepteurs adrénergiques  $\alpha_2$  et  $\beta_2$ -adrénergiques, qui stimulent la sécrétion de glucagon. Le glucagon ensuite pourrait à son tour stimuler la sécrétion d'insuline [424]. Par conséquent, l'effet net de la noradrénaline sur la sécrétion d'insuline

dépend du ratio de l'activité  $\alpha$  / $\beta$ -adrénergique sur les cellules bêta dans de différentes conditions et sur l'action du glucagon.

#### **2.6.2.1.5**     *Insuline et SNA*

Nous avons écrit une revue résumant l'effet de l'insuline et du GLP1 sur la SNA. Cet article est présenté ci-après.

## Insulin- and glucagon-like peptide-1-induced changes in heart rate and vagosympathetic activity: why they matter

P. Valensi · S. Chihab · M. Fysekidis

Received: 6 February 2013 / Accepted: 7 March 2013 / Published online: 13 April 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Heart rate (HR) predicts cardiovascular morbidity and mortality in individuals either with or without diabetes. In type 2 diabetic patients, cardiac autonomic neuropathy is a risk marker for cardiac morbidity and mortality. A major pathogenic potential may be attributed to vagal depression and sympathetic predominance. In this issue of *Diabetologia*, Berkelaar et al (DOI: 10.1007/s00125-013-2848-6) examined the effects of euglycaemic, and hyperglycaemic clamp with the addition of glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) and arginine, on cardiac vagal control in a large number of healthy subjects. After adjustments for age, BMI and insulin sensitivity, insulin associations with HR remained partially intact while those with vagal control disappeared. This suggested that BMI and insulin sensitivity, but not insulin levels, were the main drivers of cardiac vagal control. GLP-1 infusion during hyperglycaemia increased HR and BP and produced a statistically non-significant decrease in measures of cardiac vagal control compared with values before any manipulation of insulin levels. This commentary summarises how, and to what extent, insulin and GLP-1 affect autonomic nervous system activity, HR and BP. More information is needed on the mechanisms through which acute administration of, and long-term treatment with, GLP-1 may affect haemodynamics and autonomic activity in diabetic and obese patients, since this may influence cardiovascular outcomes.

**Keywords** Blood pressure · Cardiac autonomic neuropathy · GLP-1 · Heart rate · Insulin · Obesity · Type 2 diabetes

P. Valensi (✉) · S. Chihab · M. Fysekidis  
Department of Endocrinology–Diabetology–Nutrition, AP-HP,  
Jean Verdier Hospital, Paris-Nord University, CRNH-IdF,  
Avenue du 14 juillet,  
93143 Bondy Cedex, France  
e-mail: paul.valensi@jvr.aphp.fr

### Abbreviations

CAN	Cardiac autonomic neuropathy
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
HR	Heart rate
LF/HF	Ratio of low frequency peak/high frequency peak
MSNA	Muscle sympathetic nerve activity

### Introduction

An elevated heart rate (HR) is a predictor of cardiovascular morbidity and mortality in individuals with and without diabetes [1–3]. A high HR may result from several factors, including reduced vagal activity or high sympathetic activity. HR variability as assessed by cardiovascular autonomic reflex tests, which largely reflect cardiac vagal control, is lower in diabetic patients and has been recognised as an early marker of cardiac autonomic neuropathy (CAN). Lower HR variability is often observed in patients with recently diagnosed type 2 diabetes, while sympathetic activity is depressed later and causes postural hypotension that is easy to detect [4]. The role of glycaemic control in CAN is supported by DCCT data showing that, in type 1 diabetes, intensive insulin treatment reduced the incidence of CAN by 53% compared with conventional therapy [5]. Similarly, the Steno 2 study showed that, in type 2 diabetic patients, an intensive multifactorial cardiovascular risk intervention reduced the progression or the development of CAN [6].

Reduced HR variability is common in non-diabetic obese patients [7] and in individuals with impaired glucose tolerance [8]. Overweight is a major determinant of HR variability in the general population [9] and is also a major contributor to CAN in patients with type 2 diabetes [10]. In addition, elevated sympathetic activity and diminished vagal activity have been observed in individuals with the metabolic syndrome [11]. Thus, a vagosympathetic imbalance may occur prior to diabetes

as a result of overweight and insulin resistance. This is strongly supported by the recent demonstration that progression to type 2 diabetes is associated with increased central sympathetic drive, blunted sympathetic responsiveness and altered noradrenaline (norepinephrine) disposition [12]. In addition to obesity and diabetes, several factors associated with these conditions, such as insulin, proinsulin, C-peptide, glucose, leptin, adiponectin and NEFA, have been shown to affect the autonomic nervous system [13, 14].

In the Diabetes Prevention Program, randomisation of individuals considered to be at high risk of developing diabetes (BMI 24 kg/m<sup>2</sup>, fasting glucose 5.3–6.9 mmol/l, and 2 h glucose 7.8–11.0 mmol/l) to the lifestyle modification arm, which was aimed at weight reduction and engaging in physical activity, improved indices of autonomic function [15]. In overweight individuals, weight loss improved vagosympathetic balance, especially when restriction of energy intake was combined with exercise [16]. Regarding the influence of sympathetic activity in weight loss in obese individuals, higher resting sympathetic drive (as assessed by muscle sympathetic nerve activity [MSNA]) and sympathetic responsiveness to an oral glucose challenge were reported to predict dietary weight loss [17]. Similarly, among obese subjects who had undergone gastric bypass surgery, the greatest reductions in excess body weight were achieved by those observed to have a preserved capacity to shift their cardiac autonomic balance towards a sympathetic predominance during a euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp [18].

#### Pathogenic potential of a vagosympathetic imbalance

Vagal depression and sympathetic predominance are likely to contribute to insulin resistance and a decline in insulin secretion. Moreover, higher HR predicted incident diabetes in the Diabetes Prevention Program [15]. In overweight patients, glucose oxidation rate is negatively correlated with serum insulin levels only in those with cardiac vagal impairment, suggesting that sympathetic overactivity may produce a more severe insulin resistance [19]. In addition, glucose utilisation is negatively correlated with the low frequency/high frequency (LF/HF) ratio on spectral analysis of HR variability, which means that glucose utilisation is reduced when sympathetic activity is predominant [20].

In type 2 diabetic patients, CAN is a risk marker for all-cause and cardiac mortality [21], stroke, coronary events, silent myocardial ischaemia, left ventricular dysfunction, arrhythmia, and nephropathy progression [4]. Sympathetic predominance may account for these disorders and may be involved in the increased risk of cardiovascular events. Regarding the role of vagosympathetic imbalance in hypertension, some data in rats suggest that high vagal activity may protect against obesity-associated hypertension [22].

Other experimental data indicate a link between arterial stiffness and activation of the autonomic nervous system [23]. Both in patients with type 1 and type 2 diabetes, we reported that the prevalence of hypertension increases with CAN severity, which indicates a defect in vagal activity and a relative sympathetic override in hypertension [24]. In line with this, sympathetic activity is greater and baroreflex sensitivity more severely impaired in individuals with obesity and hypertension than in those with either obesity or hypertension alone [25], and similar findings have been observed for individuals with the metabolic syndrome and hypertension [26].

#### Effects of insulin on vagosympathetic activity

Insulin and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) may affect autonomic nervous system activity, HR and BP, and thus potentially alter cardiovascular outcomes. In the present issue of *Diabetologia* [27], Berkelaar et al examined the effects of high levels of insulin on cardiac vagal control in a large series of healthy volunteers with BMIs ranging from 18 to 36 kg/m<sup>2</sup>. They used exogenous insulin infusion (euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp) and stimulation of endogenous insulin production by different combinations of bolus injections and continued infusion of glucose and other secretagogues (GLP-1 and arginine) to increase levels of insulin up to a mean maximal level of 4,775 pmol/l. At every time point of the experimental protocol, insulin levels were directly associated with HR and inversely related to indices of vagal control. However, after adjusting for age, BMI and insulin sensitivity, the associations with HR remained partially intact, while those with vagal control disappeared. This suggests that BMI and insulin sensitivity, not insulin level, are the main drivers of cardiac vagal control and vagal changes during acute pharmacologically induced hyperinsulinaemia, which is consistent with the well established defect in vagal tone in overweight individuals summarised above.

During the euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp, HR and cardiac vagal activity (root mean square of successive differences in interbeat intervals [rMSSD IBI], HF, and peak-valley respiratory sinus arrhythmia, the latter surprisingly low at baseline) did not change significantly [27]. Previous studies have shown a marked increase, a slight increase or no increase in HR during euglycaemic clamps in healthy individuals [28, 29]. Consistent with previous reports [28, 29], HR elevation resulted from vagal depression, but it was also, and probably mostly, produced by cardiac sympathetic activation. Sympathetic activity has been assessed in previous clamp studies by measurement of a variety of variables. These reported that insulin increased MSNA [28, 30], plasma catecholamines [31, 32], and in some studies [29, 33] the LF/HF ratio, which

indicates relative sympathetic predominance. In fact, insulin seems to produce a regionally non-uniform increase in sympathetic activity. Insulin has been observed to increase lumbar but not renal sympathetic nerve activity in animals [34], and to increase sympathetic activity to muscle but not to skin in humans [35]. The sympatho-excitatory effects of insulin result at least in part from a central neural action and possibly from baroreflex activation secondary to peripheral vasodilation induced by insulin [36]. Moreover, the absence of BP changes during hyperinsulinaemia may result from the opposing pressor (mediated by sympathetic activation) and depressor actions (vasodilation) of insulin in the skeletal vasculature.

During the euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp the shift in cardiac autonomic nervous system activity towards sympathetic predominance (estimated by the increase in the LF/HF ratio) has been shown to be lower in obese than in lean individuals [33] and depressed in insulin-resistant patients [37]. It is increased in the offspring of insulin-resistant type 2 diabetic patients and absent in the offspring of insulin-deficient type 2 diabetic probands [38]. This suggests that chronic marked hyperinsulinaemia may prevent further enhancement of cardiac sympathetic tone during an acute rise in insulin. A similar trend towards a limited increase in sympathetic activity in obese and type 2 diabetic patients has been reported during other tests, including deep breathing, exercise and oral glucose challenge [12, 39, 40], suggesting a reduction in sympathetic reserve when sympathetic activity is relatively high at baseline. A blunted sympathetic response may result from impaired insulin transport across the blood–brain barrier, which has been shown in experimentally induced insulin resistance in dogs [41], and from lower cerebrospinal fluid insulin levels, as reported in obese insulin-resistant humans [42]. In line with this, brain insulin resistance coexists with peripheral insulin resistance [43, 44].

#### Effects of GLP-1 on vagosympathetic activity

GLP-1 may also induce changes in haemodynamic variables and modulate autonomic activity. Using a telemetry system, Griffioen et al [45] showed that in mice both acute and chronic central administration of exendin-4, a long-lasting GLP-1 receptor agonist, increased HR and reduced the HF and LF powers of HR variability. Both excitatory glutamatergic and inhibitory glycinergic neurotransmission to preganglionic parasympathetic neurons was diminished, indicating that GLP-1 receptor stimulation may induce changes in HR and HR variability by inhibiting neurotransmission to cardiac vagal neurons. GLP-1, administered peripherally or centrally, has also been shown to increase sympathetic activity in rats [46].

In a small sample of healthy individuals, GLP-1 infusion produced modest but not statistically significant increases in HR (by an average of 3 bpm) and BP and a statistically significant increase in MSNA [47]. However, there were no major modifications in plasma catecholamines or in cardiovagal or cardiosympathetic activity as assessed by spectral analysis of HR variability. In several trials, GLP-1 analogues have been shown to increase the pulse rate of diabetic and obese patients by around 3 bpm [48, 49], indicating that the IIR increase persists with long-term treatment, and have been demonstrated to produce a statistically significant decrease in systolic BP, which seems to occur before weight loss [48, 50]. Berkelaar et al [27] investigated GLP-1 infusion in healthy individuals during hyperglycaemia and reported a significant increase in HR of the same magnitude as the aforementioned trials (3 bpm). There was a slight, statistically non-significant decrease in measures of cardiac vagal control compared with those determined before any manipulation of insulin levels. This does not exclude the possibility that GLP-1-induced vagal depression could have been greater in the absence of prior hyperglycaemia and hyperinsulinaemia. Cardiac sympathetic control was not assessed with the power of the LF band or by measuring catecholamine changes, but the data suggested that sympathetic activity was enhanced since HR and systolic BP increased significantly and the double product of HR by systolic BP, a sympathetic activation index, increased accordingly. The increase in HR may be due to the huge increase in endogenous insulin levels (50-fold increase from baseline to the end of GLP-1 infusion) and insulin-mediated sympathetic activation, or to a proper sympathoexcitatory effect of GLP-1 or a direct effect on the myocardium, where GLP-1 receptors have been shown to be present [51]. C-peptide may also play a role in the regulation of the autonomic nervous system [52], but it is not known whether the action of GLP-1 could be partly mediated by the increase in C-peptide secretion.

More data are needed on the mechanisms through which GLP-1 may affect IIR and BP, acutely or during long-term treatment, and further studies on the effects of GLP-1 on haemodynamics and autonomic activity in diabetic and obese patients are required, since this may influence cardiovascular prognosis.

Insulin and GLP-1 share common effects that can contribute to an increase in HR, including vagal depression, sympathetic activation and, possibly, enhancement of the baroreflex secondary to endothelium-induced vasodilation. Both hormones may potentially affect BP in different ways depending on the presence of hypertension, cardiac autonomic impairment and endothelium function. Furthermore, the autonomic nervous system might also affect the haemodynamic response to GLP-1 through its regulatory effect on insulin secretion.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Contribution statement** All authors were responsible for the conception and design of the manuscript, drafting the article and revising it critically for important intellectual content. All authors approved the version to be published.

## References

- Carnethon MR, Yan L, Greenland P et al (2008) Resting heart rate in middle age and diabetes development in older age. *Diabetes Care* 31:335–339
- Stein PK, Barzilay JL, Domitrovich PP et al (2007) The relationship of heart rate and heart rate variability to non-diabetic fasting glucose levels and the metabolic syndrome: the Cardiovascular Health Study. *Diabet Med* 24:855–863
- Palatini P (1999) Dynamic monitoring of blood pressure and assessment of antihypertensive drugs. *Cardiologia* 44(Suppl 1):1007–1010 [article in Italian]
- Spallone V, Ziegler D, Freeman R et al (2011) Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev* 27:639–653
- The Diabetes Control and Complications trial Research Group (1998) The effect of intensive diabetes therapy on measures of autonomic nervous system function in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Diabetologia* 41:416–423
- Gaede P, Lund-Andersen H, Parving H-H, Pedersen O (2008) Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358:580–591
- Valensi P, Thi BN, Lormeau B, Paries J, Attali JR (1995) Cardiac autonomic function in obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19:113–118
- Laitinen T, Lindstrom J, Erkkonen J et al (2011) Cardiovascular autonomic dysfunction is associated with central obesity in persons with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 28:699–704
- Valensi P, Extramiana F, Lange C et al (2011) Influence of blood glucose on heart rate and cardiac autonomic function. The DESIR study. *Diabet Med* 28:440–449
- Valensi P, Paries J, Attali JR (2003) Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications—the French multicenter study. *Metabolism* 52:815–820
- Liao D, Sloan RP, Cascio WE et al (1998) Multiple metabolic syndrome is associated with lower heart rate variability. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care* 21:2116–2122
- Straznicki NE, Grima MT, Sari CI et al (2012) Neuroadrenergic dysfunction along the diabetes continuum: a comparative study in obese metabolic syndrome subjects. *Diabetes* 61:2506–2516
- Maser RE, Lenhard MJ (2007) An overview of the effect of weight loss on cardiovascular autonomic function. *Curr Diabetes Rev* 3:204–211
- Toyry JP, Niskanen LK, Mantysaari MJ et al (1997) Do high proinsulin and C-peptide levels play a role in autonomic nervous dysfunction? Power spectral analysis in patients with non-insulin-dependent diabetes and nondiabetic subjects. *Circulation* 96:1185–1191
- Carnethon MR, Prineas RJ, Tempresa M, Zhang Z-M, Uwaifo G, Molitch ME (2006) The association among autonomic nervous system function, incident diabetes, and intervention arm in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 29:914–919
- de Jonge L, Moreira EA, Martin CK, Ravussin E (2010) Impact of 6-month caloric restriction on autonomic nervous system activity in healthy, overweight, individuals. *Obesity (Silver Spring)* 18:414–416
- Straznicki NE, Eikelis N, Nestel PJ et al (2012) Baseline sympathetic nervous system activity predicts dietary weight loss in obese metabolic syndrome subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 97:605–613
- Bobbioni-Harsch E, Sztajzel J, Barthassat V et al (2005) The effect of insulin on cardiac autonomic balance predicts weight reduction after gastric bypass. *Diabetologia* 48:1258–1263
- Valensi P, Paries J, Lormeau B, Attia S, Attali J-R (2005) Influence of nutrients on cardiac autonomic function in nondiabetic overweight subjects. *Metabolism* 54:1290–1296
- Lindmark S, Lonn L, Wiklund U, Tufvesson M, Olsson T, Eriksson JW (2005) Dysregulation of the autonomic nervous system can be a link between visceral adiposity and insulin resistance. *Obes Res* 13:717–728
- Pop-Busui R, Evans GW, Gerstein HC et al (2010) Effects of cardiac autonomic dysfunction on mortality risk in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Diabetes Care* 33:1578–1584
- Valensi P, Doare L, Perret G, Germack R, Paries J, Mesangeau D (2003) Cardiovascular vagosympathetic activity in rats with ventromedial hypothalamic obesity. *Obes Res* 11:54–64
- Cosson E, Herisse M, Laude D et al (2007) Aortic stiffness and pulse pressure amplification in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:2506–2512
- Ayad F, Belhadj M, Paries J, Attali JR, Valensi P (2010) Association between cardiac autonomic neuropathy and hypertension and its potential influence on diabetic complications. *Diabet Med* 27:804–811
- Grassi G, Scavalle G, Dell’Oro R, Turri C, Bolla GB, Mancia G (2000) Adrenergic and reflex abnormalities in obesity-related hypertension. *Hypertension* 36:538–542
- Grassi G, Dell’Oro R, Quarti-Trevano F et al (2005) Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia* 48:1359–1365
- Berkelaar M, Eekhoff EMW, Simonis-Bik AMC et al (2013) Effects of induced hyperinsulinaemia with and without hyperglycaemia on measures of cardiac vagal control. *Diabetologia*. doi:10.1007/s00125-013-2848-6
- van de Borne P, Hausberg M, Hoffman RP, Mark AL, Anderson EA (1999) Hyperinsulinemia produces cardiac vagal withdrawal and nonuniform sympathetic activation in normal subjects. *Am J Physiol* 276:178–183
- Bellavere F, Cacciatori V, Moghetti P et al (1996) Acute effect of insulin on autonomic regulation of the cardiovascular system: a study by heart rate spectral analysis. *Diabet Med* 13:709–714
- Vollenweider L, Tappy L, Owlya R, Jequier E, Nicod P, Scherrer U (1995) Insulin-induced sympathetic activation and vasodilation in skeletal muscle. Effects of insulin resistance in lean subjects. *Diabetes* 44:641–645
- Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L (1981) Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 30:219–225
- Tack CJ, Lenders JW, Willemsen JJ et al (1998) Insulin stimulates epinephrine release under euglycemic conditions in humans. *Metabolism* 47:243–249
- Paolisso G, Manzella D, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Gambardella A, Varricchio M (1999) Effects of different insulin infusion rates on heart rate variability in lean and obese subjects. *Metabolism* 48:755–762
- Morgan DA, Balon TW, Ginsberg BH, Mark AL (1993) Nonuniform regional sympathetic nerve responses to hyperinsulinemia in rats. *Am J Physiol* 264:423–427
- Berne C, Fagius J, Pollare T, Hjemdahl P (1992) The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from micro-electrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* 35:873–879
- Scherrer U, Sartori C (1997) Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure



**Nous résumons ici quelques points majeurs et des données complémentaires.**

Le jeûne supprime l'activité du SNA sympathique, alors que la suralimentation la stimule [425, 426]. Ces considérations ont suggéré que l'insuline était le médiateur de ces effets nutritionnels car elle stimule l'activité sympathique. Cette théorie a été cependant discutée parce que les études sur les effets de l'insuline sur les catécholamines plasmatiques ont donné des résultats contradictoires [427, 428]. En outre, il a fallu prouver que la stimulation de l'activité sympathique par l'insuline n'est pas due à ses effets vasodilatateurs.

Des études de microneurographie ont confirmé que l'insuline stimule les nerfs sympathiques musculaires et ont prouvé que les doses physiologiques ne causent pas de vasodilatation. Ces données ont soutenu l'hypothèse que l'hyperinsulinémie et l'activation sympathique pourraient promouvoir le développement de l'HTA chez les patients atteints de DT2 et d'obésité.

L'augmentation des taux de noradrénaline dans les veines rénales a été documentée chez les patients présentant une résistance à l'insuline, quoique cela puisse refléter un effet de l'augmentation de la leptine plutôt que de l'hyperinsulinémie. L'activation des neurones sympathiques rénaux explique probablement la rétention de sodium et l'hypervolémie qui caractérisent l'HTA associée à l'obésité.

L'activation sympathique peut également conduire à une hypertrophie ventriculaire gauche et une augmentation du débit cardiaque. Ainsi, il semble qu'un grand nombre des perturbations métaboliques associées à l'obésité sont liées à l'activation du SNA sympathique. Toutefois, on ne sait pas si cette dernière est une conséquence de l'hyperinsulinémie ou d'un autre trouble métabolique lié à l'obésité.

### 2.6.2.2 GLP1 et SNA

La revue réalisée concerne également entre GLP1 et activité parasympathique.

Une étude récente a soulevé des questions sur le rôle de l'insuline dans le contrôle vagal et a suggéré un rôle du GLP1, l'hyperinsulinémie induite suite à un clamp n'était pas associée à la FC ou au contrôle cardiaque vagal après ajustement sur l'IMC et la sensibilité à l'insuline.

Chez les sujets sains, l'utilisation d'un agoniste du GLP1 dans des conditions d'hyperglycémie peut conduire à une légère hausse de la FC de façon aiguë, mais ne conduit pas à une baisse significative du contrôle vagal cardiaque. Les auteurs avaient souligné que si l'exposition au GLP1 à long terme provoquait une inhibition vagale chez des patients diabétiques plus vulnérables car pourrait être un effet nocif [429].

Le GLP1 peut modifier l'activité parasympathique et peut également induire des changements dans les variables hémodynamiques et moduler l'activité autonome. Avec l'utilisation d'un système de télémétrie, Griffioen et al ont montré chez la souris que l'administration centrale à la fois aiguë et chronique de l'Exendin-4, un agoniste du récepteur GLP1 de longue durée d'action, pourrait induire une augmentation de la FC et réduire la puissance HF et LF du spectre de la variabilité de la FC [430]. L'action centrale du GLP1 passe par un effet à la fois sur des neurones excitateurs glutamatergiques et inhibiteurs glycinergiques, ce qui suggère que la stimulation du récepteur GLP1 peut induire des changements de la FC et de la variabilité de la FC par l'inhibition de la neurotransmission au niveau des neurones vagues cardiaques.

Le GLP-1, administré en périphérie ou par voie centrale, augmente l'activité sympathique chez le rat [431]. Dans un petit échantillon d'individus en bonne santé, une perfusion de GLP1 produit de façon aiguë des augmentations modestes mais statistiquement significatives de la FC (en moyenne de 3 bpm) et de la PA, et une augmentation statistiquement significative de l'ASNM [432]. Cependant, il n'y a pas des modifications majeures des catécholamines plasmatiques ou de l'activité vagale ou sympathique cardiaque, évaluée par l'analyse spectrale de la variabilité de la FC. Dans plusieurs essais cliniques, après un traitement à long terme par analogues du GLP1, la FC des patients diabétiques et obèses augmentait d'environ 3 bpm [433], ce qui indique que l'augmentation de la FC persiste, avec une diminution significative de la PAS, même avant perte de poids [434].

Berkelaar et al [429] ont étudié la perfusion de GLP1 chez les individus sains au cours d'une hyperglycémie et ont rapporté une augmentation significative de la FC de la même amplitude que celle observée dans les essais cliniques mentionnés ci-dessus (3 bpm). Il y avait une

légère diminution, non significative statistiquement, du contrôle vagal cardiaque avant toute manipulation des niveaux d'insuline. Cela ne pouvait exclure la possibilité que l'inhibition vagale induite par le GLP1 n'aurait pas pu avoir une plus grande amplitude en l'absence d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie. Le contrôle sympathique cardiaque n'a pas été évalué avec la puissance de la bande LF ou en mesurant les changements des taux des catécholamines, mais les données suggèrent que l'activité sympathique a été renforcée vu que la FC et la PAS avaient augmenté de manière significative et que le double produit de la FC et de la PAS (un indice de l'activation sympathique) avait augmenté de façon concomitante.

L'augmentation de la FC pourrait être due à la forte augmentation des taux d'insuline (augmentation de 50 fois par rapport aux taux de base à la fin de la perfusion GLP1) et l'activation sympathique médiée par l'insuline, ou à un effet d'activation sympathique de GLP1 ou à un effet direct sur le myocarde, où les récepteurs du GLP1 sont présents [435]. Le C-peptide pourrait également jouer un rôle dans la régulation du SNA [436], mais on ne sait pas si l'action du GLP-1 pourrait être en partie médiée par l'augmentation du C-peptide.

L'effet combiné de l'insuline et du GLP1 peut contribuer à une augmentation de la FC, y compris l'inhibition vagale, l'activation sympathique et éventuellement l'activation des baroréflexes secondaire à la vasodilatation endothéliale. Les deux hormones peuvent potentiellement affecter la PA de différentes manières en fonction de la présence d'une HTA, d'une NAC et de la fonction endothéliale. En outre, le SNA peut également affecter la réponse hémodynamique de GLP1 à travers son effet régulateur sur la sécrétion d'insuline.

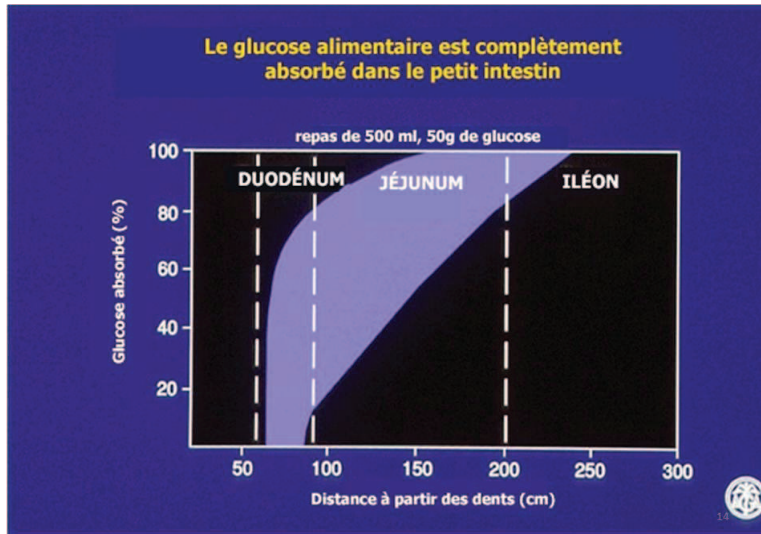
Ces données expliquent en grande partie les différences des résultats obtenus par perfusion de glucose dans des études de clamp et les résultats obtenus après une charge orale en glucose [3].

## 2.6.3 PA post prandiale

### 2.6.3.1 PA et glucose

Si on compare l'administration du glucose oral vs introduodéal, l'ampleur de la chute de la PAS et de l'augmentation de la FC sont moins importantes, ce qui reflète probablement l'effet «protecteur» de la distension gastrique [437] (**Figure 17**).

L'étude de la perfusion de glucose introduodéal est une bonne façon d'étudier l'effet de différents substrats et dans le même temps de ne pas dépendre du temps de vidange gastrique qui peut varier selon les individus.



**Figure 17: Absorption intestinale du glucose**  
(Dr Bouchoucha)

Des études récentes suggèrent que l'amplitude de la chute post-prandiale de la PA est influencée par la vitesse de la vidange gastrique. Chez les sujets âgés en bonne santé, l'ampleur de la chute de la PA et l'augmentation de la FC induite par la perfusion de glucose intra duodénale dépendent aussi du débit des nutriments arrivant dans l'intestin grêle [438]. Chez les sujets âgés en bonne santé, la charge duodénale de glucose doit être  $> 1$  kcal/min pour provoquer une chute importante de la PA [439].

Les changements physiologiques des taux de glucose, d'insuline, de GLP- 1 et de la ghréline peuvent influencer l'activité cardiaque et la PA. Les réponses hémodynamiques post-prandiales peuvent être différentes selon le sexe. Des corrélations significatives ont été trouvés entre la variation du taux de glucose et la variation de la PAS et l'aire sous courbe de 0-120 min pour la ghréline et la FC chez les hommes [440].

### 2.6.3.2 PA et autres types d'hydrates de carbone.

Les effets sur la chute de la PA ne sont pas les mêmes pour les différents types d'hydrates de carbone. Dans une étude où 50 g de glucides (saccharose ou glucose) sous forme liquide ont été administrés à des patients âgés, la PA (systolique, diastolique et moyenne) a diminué de manière similaire entre les 2 groupes, mais nettement plus que les effets observés après l'ingestion de fructose ou d'eau.

L'ingestion de fructose n'a pas provoqué de changement de PA. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer si la substitution du glucose ou du saccharose avec du fructose pourrait être bénéfique dans la prise en charge médicale des personnes âgées avec une hypotension symptomatique postprandiale sévère [441].

Comparé aux boissons contenant du glucose, celles contenant de xylose ont eu des effets minimes sur la glycémie plasmatique, les taux de Glucose-dépendent insulino-tropique peptide (GIP), l'insulinémie, mais a eu des effets puissants sur la stimulation de Glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Chez les sujets âgés en bonne santé, le xylose pourrait être éliminé de l'estomac avec la même vitesse que le glucose, mais n'a aucun effet sur la PA, peut-être parce qu'il est un puissant stimulus pour la libération de GLP-1 [442] dont nous verrons plus loin les effets.

### 2.6.3.3 PA et graisses par voie orale, intraduodénale et intraveineuse.

L'ingestion d'une boisson riche en lipides conduit à une chute comparable de la PA par rapport à une boisson glucidique mais l'apparition de ce phénomène est retardée chez les sujets âgés sains [443].

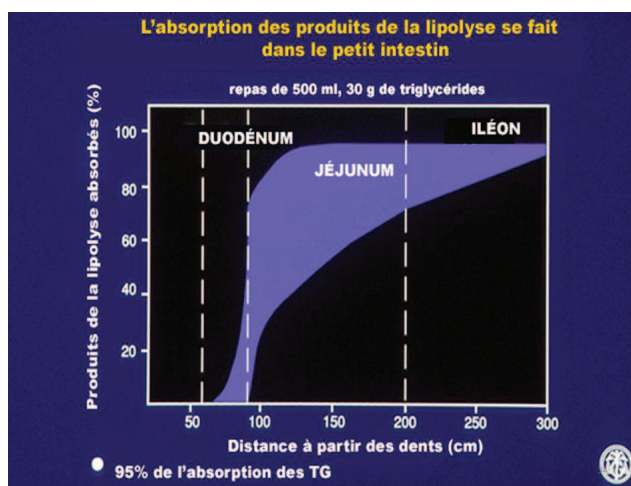


Figure 18: Absorption intestinale des graisses. (Dr Bouchoucha)

L'administration en intraduodénal de glucose, de graisse et de protéine conduit à une diminution de la PA systolique chez les sujets âgés en bonne santé, mais le début de la

réponse hypotensive est plus précoce après glucose. Pour les protéines, l'effet sur le flux sanguin sur l'artère mésentérique supérieure est inférieur à celui observé avec d'autres nutriments [444].

L'ingestion de graisse a les mêmes effets hémodynamiques chez des sujets obèses. Une charge de graisse administrée par voie orale ou intraveineuse peut considérablement augmenter la PA, modifier la fonction endothéliale et activer le système nerveux sympathique par des mécanismes probablement indépendants des taux de leptine, de glucose et d'insuline chez des sujets obèses sains [445].

Chez les sujets âgés (en moyenne 69 ans), une infusion de lipides induit une réponse différente selon le sexe. Chez les hommes, on observe une augmentation de l'insulinémie et une diminution de la résistance vasculaire, alors que chez les femmes l'insulinémie et la résistance vasculaire diminuent [446].

#### **2.6.3.4 PA post-prandiale et médicaments agissant au niveau du tube digestif**

Nous disposons d'études utilisant 3 types d'agents pharmacologiques utilisés dans le traitement du DT2: analogues du GLP-1, inhibiteur DDP4 et inhibiteur de la glucosidase, pendant la perfusion intraduodénale de glucose (technique contournant les variations de la vidange gastrique).

Les études concernant les effets cardiovasculaires du GLP-1 et de ses agonistes, qui diminuent le vidange gastrique, n'ont pas évalué les effets sur la PA et la FC séparément à jeun et en période post prandiale. Chez les sujets âgés sains, l'administration aiguë de GLP-1 atténue la réponse hypotensive après l'administration du glucose en intraduodéal, et augmente le débit de l'artère mésentérique supérieure [447].

Les effets de la sitagliptine pendant la perfusion intraduodénale de glucose à un débit de 2 kcal/min chez des patients avec DT2 augmente la FC et a été associée à une augmentation des taux plasmatiques du Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP). Ces observations suggèrent un rôle potentiel pour le GIP dans le contrôle de l'axe coeur-intestin [448].

Chez des participants âgés mais en bonne santé recevant en intraduodéal du saccharose, la prise d'acarbose a nettement atténué la réponse hypotensive en ralentissant l'absorption des glucides et a atténué l'augmentation du débit sanguin splanchnique [442].

## **2.6.4 Diabète et et autres situations pathologiques**

### **2.6.4.1 Fonction endothéliale**

La dilatation endothélium-dépendante, induite par l'hyperhémie post-occlusive, est diminuée chez des sujets présentant une intolérance au glucose ou un diabète, lorsqu'on la compare à celle survenant chez des sujets avec une tolérance au glucose normale [449].

Notre équipe a auparavant montré que l'optimisation du contrôle glycémique par une infusion sous-cutanée continue d'insuline pendant deux semaines permettait la normalisation des marqueurs biochimiques de dysfonction endothéliale [450].

### **2.6.4.2 Microcirculation et analogues insuliniques**

La cinétique rapide des nouveaux analogues insuliniques comparée à l'insuline rapide normale diminue le stress oxydatif et ressemble à une réponse physiologique. Les analogues de l'insuline comparés à l'insuline ordinaire peuvent restaurer le flux sanguin post-prandial microvasculaire chez les patients atteints de DT1.

La réponse endothéliale après une stimulation par Acetylcholine augmente à 30 et à 60 min en période postprandiale. Chez les patients atteints de DT1, le profil de la réponse observé après l'administration de l'analogue de l'insuline lispro était quasi similaire à celle observée pour les témoins non diabétiques. Cependant elle différait de celle après un traitement par insuline ordinaire. La réponse microvasculaire postprandiale à l'acetylcholine était plus forte après insuline lispro qu'après insuline normale indiquant une amélioration de la fonction endothéliale [451].

La modification du FSC par l'insulinothérapie est indépendante de son action hypoglycémiant dans le DT1 [452] à condition qu'il n'existe pas de modifications structurelles du réseau microvasculaire. La présence de la dysfonction microvasculaire est connue pour être aussi non endothélium dépendante et a été attribuée à des changements structurels qui peuvent se produire lors du diabète [453].

Dans le DT2 la cinétique d'analogues de l'insuline semble avoir le même effet que dans le DT1 et elle est responsable de la régulation du FSC. L'effet aigu induit une augmentation du flux sanguin microvasculaire de la peau comparable à celle observée pour les témoins non diabétiques [454].

Des effets similaires ont été observés dans d'autres tissus comme le myocarde où les défauts de perfusion étaient améliorés en post prandial chez les patients traités avec des analogues d'action rapide, mais pas dans le groupe traité par insuline ordinaire [455].

Des résultats similaires corrélés à la circulation coronaire renforcent l'idée que les mesures périphériques de flux sanguin cutané sont représentatives de la fonction microvasculaire en général, y compris pour les coronaires chez les sujets sains normaux [137].

L'alimentation joue un rôle primordial dans le DT2. La présence des produits de glycation avancée d'origine alimentaire également contribuent à l'altération de la fonction microvasculaire endothéliale et au stress oxydatif [456].

L'effet d'une dose unique des analogues rapides est plutôt bien étudié à court terme mais n'est pas connu après un traitement à moyen terme.

#### **2.6.4.3 Autres situations pathologiques**

Le mécanisme précis menant à l'aggravation post-prandiale de l'angine de poitrine a été attribuée à une augmentation des besoins métaboliques myocardiques (consommation d'oxygène). Ces besoins sont exprimés avec le double produit de la PA avec la FC et sont liés à l'augmentation du débit cardiaque après un repas [457].

Une chute de l'acuité visuelle post prandiale unilatérale et bilatérale a également été signalée et pourrait venir d'une hypoperfusion des circulations rétiniennes et de la choroïde suite à une maladie occlusive grave de la carotide [458].



## 2.6.5 Mécanismes neuronaux ou hormonaux?

Un bon modèle pour étudier le contrôle du débit cardiaque en post prandial est l'étude des patients après une transplantation cardiaque et des patients tétraplégiques. Dans le premier cas, le cœur est dénervé et n'est plus sous le contrôle du SNA et dans le second cas, il existe une abolition des voies descendantes sympathiques de la colonne vertébrale.

Les patients transplantés présentent une augmentation plus importante du débit cardiaque postprandial que leurs témoins appariés selon l'âge et le sexe. Les mêmes patients ont été testés 18 mois plus tard afin de réexaminer leur réponse cardiaque après l'ingestion d'un repas et déterminer l'effet d'une reinnervation cardiaque tardive.

Le débit cardiaque postprandial atteint des niveaux significativement plus élevés chez les patients que chez les témoins. La persistance d'une telle augmentation postprandiale prononcée du débit cardiaque chez les patients transplantés suggère que le cœur est amené à augmenter sa performance en période post-prandiale par l'action d'une hormone peut être d'origine pancréato duodénale [459]. La présence d'un effet hypertenseur après l'ingestion d'eau chez les jeunes patients transplantés cardiaques suggère que l'innervation vagale cardiaque est nécessaire pour empêcher cette réponse [460].

Chez les patients présentant des lésions graves de la moelle épinière cervicale, l'activité myoélectrique gastrique étudiée avec un électrogastrogramme n'est pas altérée en période postprandiale [461]. L'hypotension postprandiale, malgré la présence d'un dysfonctionnement autonome, était absente en position couchée ou inclinée [462].

Les patients atteints de lésions mi-thoraciques de la moelle épinière pourraient développer une hypotension postprandiale. Ceci diffère de la réaction hémodynamique normale d'ingestion d'un repas liquide qui est médiée par de la moelle épinière thoracique avec augmentation du tonus sympatovagal après l'ingestion alimentaire [463].

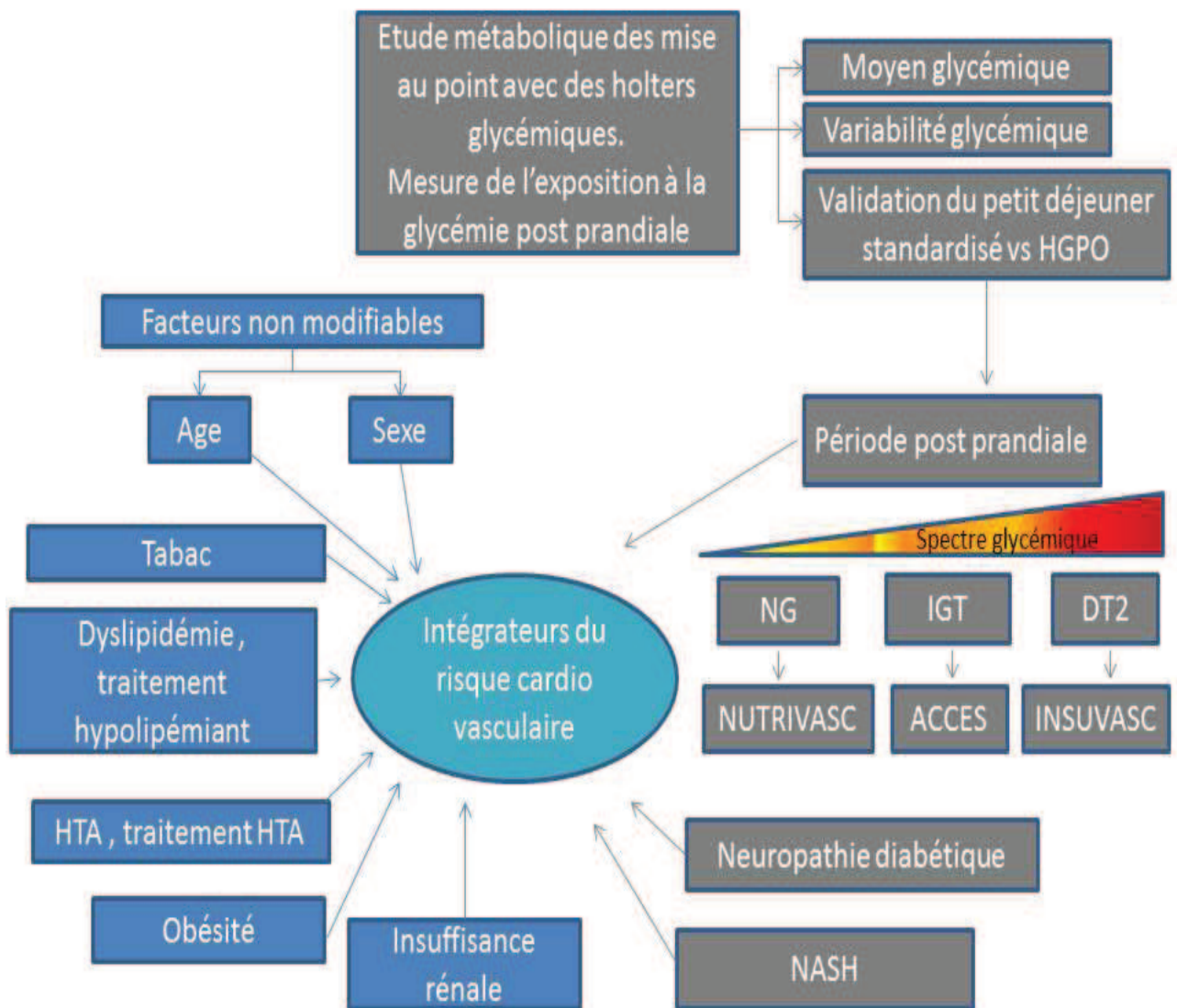
## 2.6.6 Résumé

- ❖ Dans leur papier de 1989 Fagius et Berne [3] ont décrit un résultat "surprenant" c'est à dire l'absence de réponse de l'ANSM à l'administration intraveineuse D-glucose par rapport à l'administration per os ce que les auteurs ont considéré comme "une véritable observation et non un artefact expérimental", souligne à la fois l'intérêt de l'étude de la période post prandiale comme un modèle intégrant le tube digestif, les signaux hormonaux et la réponse cardiovasculaire et l'immense complexité de ce modèle.
- ❖ Le réflexe gastrovasculaire compense la baisse de la PA liée à la diminution de la résistance artérielle splanchnique post prandiale.
- ❖ Le débit cardiaque post prandial augmente chez les patients transplantés cardiaques et présentent une augmentation plus importante du débit cardiaque par rapport aux sujets normaux, ce résultat suggère que le cœur est amené à augmenter sa performance en période post-prandiale par l'action d'une hormone peut être d'origine pancréato duodénale. Chez les sujets jeunes en bonne santé, la PAS et flux sanguin cutané ne sont pas modifiés.
- ❖ Chez les sujets jeunes en bonne santé les indices de la rigidité artérielle comme la VOP, l'Aix et l'Aix@75 diminuent pendant la période post prandiale.
- ❖ Chez le sujet sain l'hyperglycémie aiguë diminue la fonction endothéliale
- ❖ L'augmentation de l'ASNm chez les sujets sains se produit régulièrement après tout type de prise alimentaire.
- ❖ La balance sympatho-vagale cardiaque postprandiale s'élève principalement en raison de la réduction de l'activité vagale et la perfusion de lipides n'a pas d'effet important sur le contrôle autonome cardiovasculaire. Boire de l'eau augmente considérablement et rapidement l'activité sympathique. Le jeûne supprime l'activité du SNA sympathique.
- ❖ Selon le mode d'administration du glucose oral vs intraduodénale, l'ampleur de la chute de la PAS et de l'augmentation de la FC sont moins importantes pour l'administration per os. L'amplitude de la chute post-prandiale de la PA est aussi influencée par la vitesse de la vidange gastrique et les différents types d'hydrates de carbone. L'ingestion d'une boisson riche en lipides conduit à une chute comparable de la PA par rapport à une boisson glucidique mais l'apparition de ce phénomène est retardée chez les sujets âgés sains.
- ❖ L'hypotension postprandiale se produit généralement chez les personnes âgées et représente une cause majeure de morbidité.

- ❖ Les rôles des hormones sont multiples:les catécholamines stimulent la production hépatique de glucose et la lipolyse. La sécrétion d'insuline dépend du ratio de l'activité  $\alpha$  / $\beta$ -adrénergique sur les cellules bêta dans de différentes conditions et sur l'action du glucagon.
- ❖ Le métabolisme basal, est régulé par les hormones thyroïdiennes, alors que la thermogenèse facultative est régulée par le système nerveux adrénergique.
- ❖ L'insuline induit une diminution de l'Aix chez les sujets sains tandis que cet effet de l'insuline est diminué chez les DT2.
- ❖ Le GLP1 peut modifier l'activité parasymphatique et peut également induire des changements dans les variables hémodynamiques et moduler l'activité autonome.
- ❖ Chez les diabétiques la fonction endothéliale reste diminuée. Le traitement par les analogues rapides de l'insuline comparés à l'insuline ordinaire peut restaurer le flux sanguin post-prandial microvasculaire chez les patients atteints de DT1.
- ❖ Cette partie décrit la présence des plusieurs facteurs qu'on doit prendre en compte en étudiant les modifications hémodynamiques post prandiales. L'interaction des mécanismes hormonaux ou neuronaux et l'âge des sujets qui participent dans l'étude sont des facteurs importants. Les niveaux des mesures de l'activité du SNA, cardiaque ou ASNM.
- ❖ Le type de repas: liquide vs solide et leur contenu en glucides peuvent induire des grandes différences aux paramètres étudiés.

# Troisième partie

## 3 Travaux personnels-Questions posées



Cette troisième partie de la thèse présente les résultats des travaux personnels. Dans la deuxième partie nous avons déjà défini les intégrateurs du risque cardiovasculaire ainsi que les facteurs classiques modifiables ou non modifiables qui ont un impact direct sur ces indices.

Dans un premier temps, nous avons mené une étude métabolique en utilisant des holters glycémiques pour la mise au point des mesures de la variabilité glycémique sur tout le spectre glycémique. Ensuite, nous avons pu valider avec la même étude l'utilisation d'un petit déjeuner standardisé (c'est-à-dire notre outil de travail pour l'étude de la réponse postprandiale) en comparant la cinétique de la glycémie avec celle d'une charge orale en glucose. Le vrai avantage du petit déjeuner est qu'il ressemble aux habitudes alimentaires françaises et qu'il est très bien toléré, ce qui n'est pas le cas avec la charge orale en glucose.

Nous avons étudié l'impact de la réponse postprandiale aux intégrateurs du risque cardiovasculaire de façon systématique avec trois études qui couvrent aussi la totalité du spectre glycémique. Nous avons étudié des sujets normo-glycémiques (NUTRIVASC) intolérants au glucose (ACCES) et diabétiques de type 2 (INSUVASC). Les résultats de l'étude ACCES sont en cours d'analyse et son protocole est disponible sur la partie annexe de la thèse.

Nous avons voulu étudier aussi le rôle des facteurs dit non classiques et pour cette raison nous avons mené deux études sur l'association de la stéato-hépatite métabolique (NASH) et de la neuropathie diabétique.

### **3.1 Contribution de la glycémie post prandiale sur l'exposition glycémique chez des sujets sans dysglycémie connue**

#### **3.1.1 Introduction**

##### **3.1.1.1 Glycémie post prandiale et pronostique cardio-vasculaire**

###### **3.1.1.1.1 *Sujets sans diabète***

Les anomalies précoces du métabolisme glucidique sont associées à un mauvais pronostic cardio-vasculaire. Dans l'étude prospective parisienne qui incluait des hommes sans diabète connu et âgés de 44 à 55 ans à l'inclusion, la comparaison de la mortalité cardio-vasculaire à 24 ans selon la glycémie à jeun ou la glycémie à 2 heures après une charge orale en glucose a montré qu'une glycémie à 2 heures élevée était de plus mauvais pronostic que des glycémies à jeun élevées [464]. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent fortement que la glycémie post-prandiale est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire dans la population saine.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude Hoorn [465], le Honolulu Heart Program [466] et la Chicago Heart Association Detection Project in Industry study [467]. Le pronostic péjoratif associé à des glycémies post-stimulatives élevées a été confirmé par la méta-analyse d'études européennes DECODE (Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe) [468].

###### **3.1.1.1.2 *Sujets ayant un diabète***

La glycémie post-prandiale est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire chez les diabétiques de type 2 [469]. L'étude DIS (Diabetes Intervention Study) a mis en évidence le rôle de l'hyperglycémie post prandiale sur l'athérosclérose et la mortalité cardiovasculaire [470]. Toutefois il n'existe pas d'études reliant ce risque aux taux de glycémie après un repas test et la plupart des conclusions sont extrapolées à partir d'études en population saine qui ont recouru à une charge orale en glucose. La baisse de la mortalité cardiovasculaire sous acarbose chez des sujets intolérants au glucose dans l'étude Study TO Prevent Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus (STOP-NIDDM) [471] vient soutenir le rôle de l'hyperglycémie post-prandiale dans le risque cardiovasculaire.

La glycémie après charge orale est un meilleur marqueur du risque de survenu des complications diabétiques microvasculaires que la glycémie à jeun [472].

### 3.1.1.2 Autosurveillance glycémique et Mesure du Glucose en Continu (MGC)

L'autosurveillance glycémique (ASG) est un outil important dans la prise en charge du diabète. Alors que l'ASG est essentielle, elle ne suffit pas en soi pour promouvoir une gestion optimale du diabète et des actions après l'ASG sont nécessaires afin de parfaire l'équilibre glycémique. L'éducation des patients afin qu'ils puissent prévenir ou retarder les complications de cette maladie constitue une avancée thérapeutique. Plusieurs études ont prouvé l'importance du contrôle de la glycémie sur la réduction des complications à court et à long terme. L'un des principaux outils pour améliorer le contrôle glycémique est l'ASG. Nous disposons maintenant d'une technologie qui permet aussi la mesure du glucose en continu (MGC). Un autre aspect important de la prise en charge du diabète est la prévention de l'hypoglycémie. Les données disponibles ont mis en évidence que les MGC réduisent et préviennent les hypoglycémies.

Une des mesures les plus souvent utilisées pour la surveillance du contrôle du glucose à long terme est l'hémoglobine glyquée (HbA1c). Cependant, dans un grand sous-groupe de personnes atteintes de diabète, environ 15% des valeurs HbA1c pourraient être fausses. Plus précisément, dans certains groupes ethniques, les personnes souffrant d'une drépanocytose et les patients atteints de maladie rénale sévère ont des niveaux HbA1c qui ne sont pas en corrélation avec la glycémie moyenne. D'autre part l' HbA1c ne fournit pas une image des hypoglycémies et/ou des épisodes hyperglycémiques. Pour ces patients, la MGC est pratiquement le moyen le plus utilisé pour évaluer le contrôle glycémique [473].

Un consensus d'experts a suggéré que les patients diabétiques de type 1 devraient faire leur ASG au moins 8 fois par jour. L'American Diabetes Association recommande que les patients sous insulinothérapie intensive doivent faire une ASG avant les repas et les collations, parfois après les repas, au coucher, avant une activité physique importante, quand ils soupçonnent une hypoglycémie, après le traitement de l'hypoglycémie, et avant les tâches quotidiennes importantes (par exemple, conduite) [474]. Une ASG fréquente réduit la fréquence des hypoglycémies. Dans une étude sur les personnes atteintes de diabète de type 1, la fréquence accrue de l'ASG a diminué de façon significative l'HbA1c dans tous les groupes indépendamment de leur âge [475]. Bien qu'il n'y ait pas de limite supérieure à la fréquence de la surveillance quotidienne qui pourrait offrir plus d'avantages au contrôle de l'HbA1c, l'effet semble commencer à ne plus être significatif à partir de 7 à 8 fois par jour [476].

Les données épidémiologiques observationnelles indiquent que l'ASG est corrélée avec une diminution des complications liées au diabète et à la mortalité toutes causes confondues chez les personnes atteintes de diabète de type 2. Chez ces patients le risque de l'hypoglycémie croît avec le nombre d'injections quotidiennes d'insuline. Les femmes enceintes traitées par

l'insuline doivent surveiller leur glycémie au moins 8 fois par jour. De grands essais randomisés sont nécessaires pour valider les opinions d'experts [477].

### **3.1.1.3 Mesure du Glucose en Continu**

L'utilisation de la MGC a amélioré les résultats cliniques du diabète en réduisant l'hypoglycémie [478]. La MGC est recommandée chez tous les patients avec diabète de type 1 et devrait être disponible aussi pour les diabétiques de type 2 traités par plusieurs injections d'insuline, insuline basale, ou sulfonylurées. La MGC devrait également être utilisée chez tous les patients qui sont à risque d'hypoglycémie et / ou ayant eu une hypoglycémie sévère [479]. Alors que les études utilisant MGC dans le diabète de type 2 sont limitées dans la pratique clinique elle peut être aussi utile pour identifier et corriger les excursions glycémiques post-prandiales [480]. L'opinion d'experts pour l'utilisation intermittente de la MGC (habituellement 1-2 semaines) chez les patients atteints de diabète de type 2 est qu'elle peut être plus efficace que l'ASG quotidienne pour l'ajustement du traitement [481].

### **3.1.1.4 Précision et évènements indésirables**

Les données existantes indiquent que la précision de l'ASG augmente la confiance des patients, améliore l'adhérence, les adaptations d'insuline, et la qualité de vie [482]. Les valeurs qui sont situées dans les limites sont plus problématiques en particulier les erreurs dans ou autour de la gamme hypoglycémique qui peuvent avoir des conséquences graves pour la prise d'une décision thérapeutique immédiate [483].

Les données sur des effets indésirables infligés au patient suite à un dysfonctionnement de son appareil d'ASG ne sont pas disponibles de façon systématique et leur déclaration n'est pas standardisée. A l'heure actuelle la traçabilité des événements indésirables est difficile à mettre en place (fabricant de bandelette, la société pharmaceutique, le patient, ou la progression de la maladie).



### 3.1.1.5 Description du système de la MGC

La plupart des appareils de MGC sont composés de 3 parties : un capteur, un émetteur qui est fixé sur le corps et un récepteur. Le capteur est inséré dans le tissu sous cutané, le plus souvent dans l'abdomen ou sur la partie supérieure du bras. Il emploie un tampon adhésif solide pour fournir une base solide pour fixer l'émetteur sans fil, qui transmet des données de mesure de glucose pour le récepteur jusqu'à une distance de 3-5 m. Le récepteur peut être une unité autonome avec des tests de glycémie capillaire intégrés. L'écran du récepteur affiche le niveau de glucose en temps réel, les tendances hyper et hypoglycémiques et les mesures en continu de glucose. Il existe également des systèmes aveugles sur lesquels les données ne sont pas disponibles en temps réel et nécessitent d'être téléchargées pour être visualisées. La plupart des capteurs ont une durée de vie de 5 à 14 jours; presque tous les capteurs nécessitent une calibration avec 3 ou 4 glycémies capillaires pendant la période de leur utilisation. Le développement de la MGC a permis la comparaison de la cinétique entre le glucose plasmatique et le glucose interstitiel chez des sujets sains. Après l'augmentation de la glycémie suite à une HGPO, l'augmentation du glucose interstitiel arrive après l'augmentation de la concentration du glucose dans le sang. En revanche, la diminution de la concentration de glucose interstitiel se produit en premier [484]. Un tel phénomène a également été observé chez les rats non diabétiques: au cours de l'hypoglycémie induite par l'insuline, la concentration du glucose interstitiel contrôlée avec un capteur sous-cutané diminue la première [485].

Par ailleurs, les niveaux glycémiques interstitiels sont inférieurs aux valeurs plasmatiques pendant une légère hypoglycémie et pendant la récupération d'une hypoglycémie [486]. Ce phénomène appelé « push-pull » est lié à l'action rapide de l'insuline dans le milieu interstitiel.

La détection non enzymatique du glucose implique l'oxydation directe du glucose en acide gluconique par l'oxydase du glucose. L'enzyme est soit étalée sur la surface de l'électrode et dépend d'un potentiel électrique, soit incorporée dans l'électrode et oxyde de façon directe le glucose sans l'utilisation d'un potentiel électrique

### 3.1.1.6 Évaluation de la contribution absolue et relative des glycémies post-prandiales à l'HbA1c chez des patients diabétiques de type 2

Les travaux de Monnier et coll nous ont permis de comprendre l'effet de l'exposition globale à l'hyperglycémie. Chez un patient diabétique cette exposition peut être estimée en calculant l'aire sous la courbe du profil glycémique des 24 heures. En conséquence, la contribution absolue de la PPG à l'augmentation de l'HbA1c peut être définie comme la proportion de l'HbA1c (exposition totale de glucose) par rapport à l'exposition PPG [487]. Dans tous les groupes de patients qui avaient un taux d'HbA1c > 6,5%, la contribution absolue des excursions PPG à l'HbA1c était constante, d'environ 1 %. La contribution absolue des excursions PPG a été trouvée inférieure à 0,7% chez ceux qui étaient bien contrôlés avec un taux d'HbA1c < 6,5%. Ce résultat reste une description simple et généralisable de la contribution apportée par les excursions à PPG dans l'exposition globale au glucose [488].

La contribution relative de la glycémie postprandiale (en pourcentage) peut être exprimée avec la formule  $(1 / [\text{HbA1c} - 5,7]) \times 100$ . La contribution relative de l'hyperglycémie basale (en pourcentage) est calculée par différence: 100% - la contribution de la glycémie postprandiale en %.

L'évaluation de la contribution relative dépend des seuils des taux glycémiques choisis pour la glycémie à jeun. Par exemple, la contribution de glucose basale peut être soit surestimée soit sous-estimée selon que la limite supérieure de la glycémie à jeun est fixée à 100 mg / dL ou à 110 mg / dL (avant 2003).

Supposons que cinq sous-groupes de patients aient des différents niveaux de HbA1c moyenne 7%, 8%, 9%, 10% et 11%, respectivement, et supposons que 5,7% soit la limite supérieure de l'HbA1c normale chez les personnes normoglycémiques. Comme la PPG contribue pour environ de 1% aux taux de l'HbA1c dans tous ces cinq sous-groupes, les contributions relatives de PPG (en pourcentage) de l'augmentation globale de la glycémie est de 77% ( $1 / [7 - 5,7] \times 100$ ) dans le premier sous-groupe, 43% dans le deuxième, 30% le troisième, 23% dans le quatrième et 19% dans le cinquième. Les contributions relatives de l'hyperglycémie basale, exprimées en pourcentage de l'hyperglycémie globale, peuvent facilement être calculées et sont respectivement de 23%, 57%, 70%, 77% et 81%. Toutes ces observations confirment que la contribution relative de la PPG est prédominante chez les patients présentant un bon contrôle du diabète sur la base de l'HbA1c, tandis que le glucose basale devient le principal contributeur chez les patients diabétiques mal contrôlés [489].

La contribution de la glycémie post prandiale chez les sujets sains sans dysglycémie connue constitue le premier travail dans le cadre de cette thèse et nous permet d'avoir des résultats sur la contribution de la glycémie postprandiale dans le continuum glycémique c'est-à-dire dans le passage de la normoglycémie à l'intolérance au glucose et finalement au diabète de type 2.

### **3.1.2 Mise au point d'une méthode d'étude de la glycémie en période post prandiale utilisant un holter glycémique. Etude chez des patients obèses.**

#### **3.1.2.1 Objectif**

Il a été montré chez les diabétique de type 2 que la contribution de la glycémie postprandiale à l'hyperglycémie diurne globale des 24 heures était plus importante pour les valeurs basses (<7,5%) de l'HbA1c. La contribution de la glycémie à jeûne/postprandiale et l'exposition hyperglycémique chez des sujets en surpoids ou obèses sans dysglycémie connue n'ont pas été étudiées à ce jour.

Quant à la variabilité glycémique (VG) chez ces patients, nous avons fait l'hypothèse que la VG de 24 heures serait plus élevée chez les patients ayant des niveaux élevés d'HbA1c. Pour répondre à ces points, des patients en surpoids ou obèses ont eu une surveillance continue du glucose (CGM : Continuous Glucose Monitoring).

#### **3.1.2.2 Méthodes**

##### **3.1.2.2.1 *Patients***

Nous avons inclus de façon prospective de Mars 2006 à Décembre 2010, 72 patients consécutifs en surpoids ou obèses (indice de masse corporelle (IMC) > 25 kg / m<sup>2</sup>). Les participants n'avaient pas de troubles glycémiques connus ni de traitement antidiabétique. Les participants ont été recrutés parmi les patients ambulatoires suivis dans notre département pour bilan d'obésité. Ils n'avaient pas de maladie aiguë et étaient dans un état stable. Le but de l'étude était d'évaluer les troubles métaboliques associés à l'obésité. Les critères d'inclusion étaient un IMC supérieur à 25 kg / m<sup>2</sup> et un âge de 18 à 70 ans. Les enregistrements ont été considérés comme de bonne qualité quand il n'y avait pas de données manquantes pour la période post-prandiale et pas plus de 20 minutes de données manquantes pendant la période de jeûne ou postabsorptive. Les participants ont donné leur consentement éclairé et ont été admis dans le Service d'Endocrinologie – Diabetologie - Nutrition de l'hôpital Jean Verdier (jour 0).

### 3.1.2.2.2 *Hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)*

L'HGPO a été effectuée dans la matinée de la première journée après 12 heures de jeûne. Le test consistait en deux dosages de la glycémie: à jeûn et 120 minutes après avoir bu une solution de 75 g de glucose dans 200 ml d'eau en 5 minutes. On a demandé aux patients de prendre 250 g de confiture dans l'après-midi (jour 0) avant l'HGPO, afin de compenser une restriction glucidique fréquente sur la journée précédente .

### 3.1.2.2.3 *Holter Glycémique (CGM)*

Le dispositif CGM (Guardian RT, Medtronic, Northridge, CA) a été placé dans la matinée du jour 1 au moins 2 heures avant l'HGPO. La mesure du glucose interstitiel a été validée avec au moins 3 à 4 mesures de glycémie capillaire selon les indications du fabricant. L'enregistrement CGM a duré 24 heures, le jour 1 de 00:00 à 24:00 et a été analysé pour chaque patient. Nous avons demandé aux participants de ne pas avoir d'activité physique, de toujours utiliser les ascenseurs de l'hôpital et pendant la journée 1 de rester à l'intérieur de leur chambre d'hôpital pendant 24 heures. L'apport calorique quotidien a été fixé à 1 800 kcal et a été divisé en 3 repas sans prise des collations. Cet apport représentait environ la dépense basale quotidienne moyenne d'énergie calculée précédemment pour les patients obèses de notre département .

## Protocole de l'étude

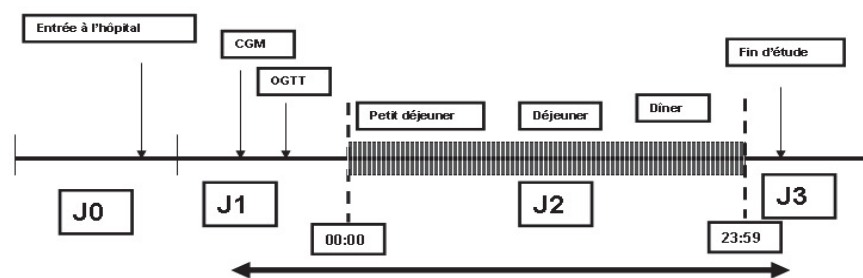


Figure 19 : *Protocole de l'étude CGM*

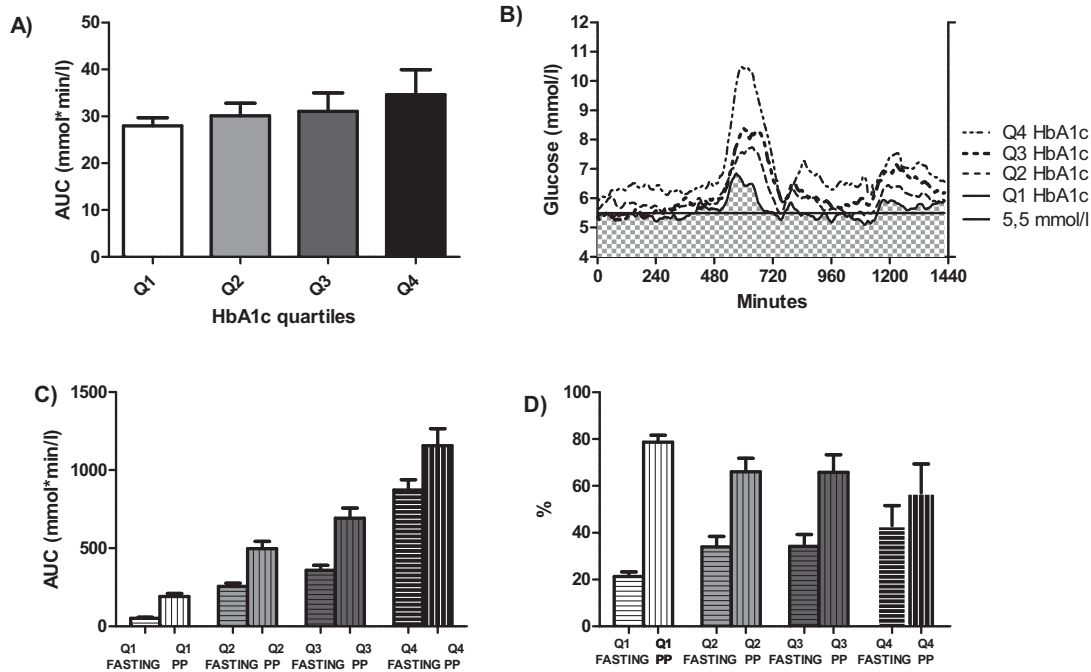
#### **3.1.2.2.4**     *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS statistiques (version 13.0, Chicago, IL). Les variables ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SD ou sous forme de pourcentages. Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour analyser les associations entre les variables continues. Les groupes de quartiles d'HbA1c (Q1 à Q4) ont été comparés par analyse de variances lorsque les écarts étaient homogènes. La correction de Bonferroni pour les tests multiples a été utilisée pour les analyses post-hoc. Lorsque les écart types n'étaient pas homogènes, même après transformation, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney U. Le test du chi carré a été utilisé pour les variables catégorielles. Le fait que deux patients ayant des enregistrements de CGM de mauvaise qualité aient été exclus de l'analyse, nous a conduit à réaliser l'analyse « sur le traitement » et non « en intention de traiter ». La taille de notre population pour un test bilatéral ( $\alpha=5\%$ ) afin d'obtenir une puissance statistique de 80% et un niveau de probabilité à ( $\alpha/4=0,0125$ ) avec un effet attendu estimé à 1,3 pour la contribution de l'hyperglycémie «relative» PPG entre les quartiles de l'HbA1c (%). Le nombre total d'au moins 72 patients (18 sujets dans chaque groupe) a été décidé afin de surmonter les distributions inégales de l'HbA1c en raison de la nature imprévisible des inclusions consécutives ou la présence de données manquantes. La puissance de l'étude n'a pas été affectée par l'exclusion des 2 patients qui avaient des enregistrements de mauvaise qualité du CGM à la fin de l'étude. Bien que nous ne puissions pas exclure formellement la présence de biais, l'impact des données manquantes devait être minime, car ils représentaient 2,8% de l'ensemble des données et c'est la raison pour laquelle nous pensons que les analyses «sur le traitement» et «intention de traiter» mèneraient à des résultats similaires.

#### **3.1.2.3 Résultats**

##### **3.1.2.3.1**     *Contribution de la glycémie post prandiale (PPG)*

Le pourcentage de contribution de la PPG à une hyperglycémie relative  $> 5,5$  mmol/L a été calculé pour chaque quartile d' HbA1c par la formule  $[100 \times (\text{Aire sous Courbe (AUC) postprandiale 3 h} - \text{AUC sur 3 h pour une glycémie constante de } 5,5 \text{ mmol / L}) / (\text{total 24 h AUC} - \text{AUC sur 24h pour une glycémie constante de } 5,5 \text{ mmol / L})]$  tel que décrit précédemment dans l'article de référence de Monnier et al. [487].



**Figure 20:** Enregistrement CGM de 24 heures

A) La moyenne de l'AUC de 24 heures du glucose interstitiel était différent entre Q1 à Q4 ( $p < 0,0001$ , fig. 1A). C) La somme de l'exposition hyperglycémique  $>5\text{mmol/L}$  sur 24 heures a augmenté de Q1 à Q4 ( $p < 0,001$ ), exprimé par les AUC de jeûne / post-absorptive et postprandiales dans la figure 1C. De Q1 au Q4 l'AUC jeûne / post-absorptive augmentait de 17 fois et l'AUC postprandial 7 fois ( $p < 0,001$ ). D) La contribution relative de la période post-prandiale à hyperglycémie totale diminuait de Q1 au Q4 ( $81 \pm 3\%$ ,  $66 \pm 6\%$ ,  $66 \pm 7\%$ ,  $57 \pm 12\%$   $p < 0,05$ ); Q4 à jeun et Q4 PPG étaient significativement différents ( $p < 0,001$ ).

L'AUC totale reflète l'exposition glycémique absolue, l'AUC totale augmente pour les deux périodes c'est-à-dire jeûne / postabsorptive et postprandiale, résultant en une augmentation surtout dans le quartile le plus élevé de l'HbA1c, dans lequel l'AUC à jeun était plus importante que l'AUC postprandiale en Q3. Une conclusion importante est que chez les patients sans trouble du métabolisme glucidique connu, la contribution postprandiale à l'hyperglycémie totale est toujours supérieur à la contribution à jeun /post-absorptive dans le même quartile de l'HbA1c. La contribution de la période post-prandiale à l' "hyperglycémie relative" commence de 81 % en moyen dans le premier quartile de HbA1c s'abaisse à 57% dans le Q4 tandis que la glycémie à jeun augmente. Ce résultat suggère comme il a été déjà publié que, même avant l'apparition du diabète, la présence d'une glycémie postprandiale anormale se traduira par une hyperglycémie à jeun ( $>1,10\text{ g/L}$ ). La perte du contrôle de la glycémie post-prandiale précède donc la détérioration de la glycémie à jeun, avant même l'apparition du diabète.

La PPG est restée le principal contributeur de «hyperglycémie relative» dans tous les quartiles, la présence d'un petit échantillon n'a pas permis d'établir une valeur seuil de l'HbA1c pour l'apparition de diabète.

### **3.1.2.3.2 Variabilité glycémique**

L'augmentation des quartiles d'HbA1c a été trouvée associée avec tous les indices de variabilité glycémique, à l'exception du LBGI, M-Value et MAG. MAGe était fortement corrélé avec d'autres indices de variabilité glycémique comme SD ( $r = 0,901$ ,  $p < 0,001$ ), CV % ( $r = 0,890$ ,  $p < 0,001$ ), LI ( $r = 0,918$ ,  $p < 0,001$ ), J Index ( $r = 0,747$ ,  $p < 0,001$ ), HBGI ( $r = 0,857$ ,  $p < 0,001$ ). L'HbA1c corrélait avec des valeurs moyennes de glycémie des 24 heures ( $r = 0,572$ ,  $p < 0,001$ ). MAGe corrélait avec le taux d'HbA1c et augmentait en fonction de l'état glycémique ( $1,9 \pm 0,75$ ,  $3,5 \pm 1,4$  et  $5,6 \pm 2,3$  pour les patients avec normoglycémie, hyperglycémie intermédiaire ou prédiabète et le diabète, respectivement;  $p < 0,001$ ).

Ainsi la variabilité glycémique augmente en même temps avec la présence de désordres plus importants et l'augmentation concomitante de l'HbA1c.

Il existe peu de données disponibles sur la pertinence clinique des indices de variabilité glycémique dans les états prédiabétiques et la présence des comorbidités. Dans une étude récente, aucune corrélation n'a été trouvée entre l'épaisseur intima-média de la carotide et le MAGe. La raison la plus probable est que l'amplitude de MAGe des participants était relativement faible par rapport à celle des patients atteints de diabète. Il existe des preuves en faveur de l'existence d'une relation entre la neuropathie périphérique et l'intolérance au glucose. Les principaux mécanismes pathogéniques sont susceptibles de résulter de l'hyperglycémie postprandiale qui provoque un stress oxydatif de faible amplitude répétitif capable de prédisposer à des complications précoces [490]. La glycémie postprandiale chez les personnes ayant une intolérance au glucose est également associée de façon indépendante aux complications microvasculaires traditionnelles comme la rétinopathie [491].

Une limite de notre étude était la petite taille de l'échantillon, le fait que nous ne pouvons pas exclure un biais de sélection et que nous pouvions analyser l'exposition de glucose moyenne et la variabilité glycémique seulement sur 24 heures de CGM et donc la répétitivité de nos résultats n'a pas pu être testée.





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Metabolism

[www.metabolismjournal.com](http://www.metabolismjournal.com)

## Increased glycemic variability and decrease of the postprandial glucose contribution to HbA1c in obese subjects across the glycemic continuum from normal glycemia to first time diagnosed diabetes☆☆☆

Marinos Fysekidis<sup>a,b</sup>, Emmanuel Cosson<sup>a,b</sup>, Isabela Banu<sup>a</sup>, Régine Duteil<sup>a</sup>, Chantal Cyrille<sup>a</sup>, Paul Valensi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> AP-HP, Jean Verdier Hospital, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Department of Endocrinology–Diabetology–Nutrition, CRNH-IdF, CINTO, Bondy, France

<sup>b</sup> Sorbonne Paris Cité, UMR U1153 Inserm/U1125 Inra/Cnam/Université Paris 13, Bobigny, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 April 2014

Accepted 19 September 2014

## Keywords:

Prediabetes

Obesity

Contribution to Hb1Ac

## ABSTRACT

**Objective.** The contribution of postprandial glycemia (PPG) to hyperglycemia has been shown to decrease as HbA1c increased in type 2 diabetic patients. This study aimed at examining, in a series of overweight/obese patients without known glycemic disorder, the contribution of PPG to a "relative" hyperglycemia (glucose values  $\geq 5.5$  mmol/L) and the presence of glycemic variability according to HbA1c levels.

**Methods.** Seventy overweight/obese inpatients (body mass index  $35.2 \pm 6.8$  kg/m<sup>2</sup>) without known glycemic disorder were included. Participants were classified according to an oral glucose tolerance test (according to the American Diabetes Association criteria) as patients with normoglycemia ( $n = 33$ ), with intermediate hyperglycemia ( $n = 24$ ) or diabetes ( $n = 13$ ). They were separated into HbA1c quartiles (Q1 to Q4). A 24 hour continuous glucose monitoring was used under a 1800 kcal diet and minimal physical activity. We assessed PPG contribution (3 hour period after each meal) to the "relative" 24 hour hyperglycemia (glucose values  $\geq 5.5$  mmol/L); the remaining time was considered as the fasting/post-absorptive period.

**Results.** HbA1c range was from 5.1% to 7.4% (32 to 57 mmol/mmol). From the lowest to the highest HbA1c quartile, the area under the curve (AUC) for the "relative" hyperglycemia presented a 17-fold increase for the fasting/post-absorptive ( $p < 0.001$ ) period and a 7-fold increase postprandially ( $p < 0.001$ ). The percent of PPG contribution to the "relative"

**Abbreviations:** HbA1c, Glycated Hemoglobin; CGM, Continuous Glucose Monitoring; PPG, Postprandial Glycemia; OGTT, Oral Glucose Tolerance Test; GV, Glycemic Variability; BMI, Body Mass Index; AUC, Area under the Curve; MBG, Mean Blood Glucose; MAGE, Mean Amplitude of Glycemic Excursions; SD, Daily Standard Deviation; CV%, Coefficient of Variation; CONGA, Continuous Overlapping Net Glycemic Action; HBGI, High Blood Glucose index; LBGI, Low Blood Glucose Index; LI, Liability Index; MAG, Mean Absolute Glucose; HOMA, Homeostasis Model Assessment.

\* All authors declare no potential conflict of interest relevant to this article.

\*\*\* Funding: This research was made possible thanks to the kind provision of GCM devices by Medtronic.

\* Corresponding author at: Department of Endocrinology–Diabetology–Nutrition, Jean Verdier Hospital, Avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy Cedex, France. Tel.: + 33 148026580; fax: + 33 148026356.

E-mail address: [paul.valensi@jvr.aphp.fr](mailto:paul.valensi@jvr.aphp.fr) (P. Valensi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.006>

0026-0495/© 2014 Published by Elsevier Inc.

hyperglycemia was calculated with the following formula [ $100 \times (\text{postprandial 3 hour AUC} - 3 \text{ h AUC for a constant 5.5 mmol/L glycemia}) / (\text{total 24 h AUC} - 24 \text{ h AUC for constant 5.5 mmol/L glycemia})$ ] and decreased from Q1 to Q4 of HbA1c (81.2%, 66%, 65.8%, 57%;  $p < 0.001$ ). Increasing HbA1c quartiles were associated with higher daily mean blood glucose level ( $p < 0.001$ ) and higher levels of daily glucose variability indices, including mean amplitude of glycemic excursions ( $p < 0.01$ ).

Conclusions In overweight/obese patients, HbA1c was associated with lower PPG contribution to "relative" hyperglycemia and greater glycemic variability. The present findings support the importance of postprandial period in glycemic exposure even before the appearance of diabetes.

© 2014 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

Glycated hemoglobin (HbA1c) is a reflection of the 12-week glycaemic exposure and remains the gold standard for the management and therapy adjustment in diabetic patients since high HbA1c levels are associated with an increased risk for long-term diabetic complications [1,2]. The recent introduction of a new reference method in order to calibrate all HbA1c assay instruments [3] has improved HbA1c assay standardization by providing low pre-analytic instability and biologic variability [1,4]. HbA1c has recently been proposed as a diagnostic criterion for diabetes and as a tool to identify individuals at high risk for diabetes [5].

With the use of continuous glucose monitoring (CGM) devices it is now possible to separate the various components of glycaemic exposure and measure the contribution of fasting/post absorptive glycaemia and postprandial glycaemia (PPG) to the overall hyperglycaemia. It has been shown in type 2 diabetic patients that PPG contribution to the overall diurnal hyperglycaemia was greater when HbA1c was low [6,7]. High PPG may have major consequences, as illustrated by the increased mortality in individuals with abnormal 2-hour plasma glucose after an oral glucose tolerance test (OGTT) but not those with increased fasting plasma glucose values [8]. In addition to the previous findings the magnitude of glycemic variability (GV) differs according to glucose exposure. This is clinically relevant since GV has been proposed as a predictor of cellular damage and microvascular complications in diabetic patients [9,10]. The major pathogenic mechanisms involved in this process seem to be the induction of oxidative stress [11,12] and endothelial dysfunction [12].

Data from the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) have shown that the decline in  $\beta$ -cell function begins several years before the appearance of diabetes [13]. High PPG seems to occur before the deterioration of fasting glucose levels during diabetes [14], a phenomenon mainly due to the disruption of the early phase of insulin secretion [15,16]. It has already been shown that in non-diabetic patients there is a wide variation in plasma insulin levels after an OGTT with both insulin action and insulin secretion being the determinants of plasma glucose [17]. There are no data describing the PPG contribution to overall hyperglycaemia and the levels of GV according to HbA1c with the use of CGM. We have made the hypothesis that, in overweight/obese patients without known dysglycaemia postprandial contribution to hyperglycaemia would have an inverse relationship with HbA1c, as it is the case in the diabetic population [6,7]. We also hypothesized that, in the

same group of patients, the 24-hour GV would be the highest in those with high HbA1c levels. To address these points, overweight or obese patients underwent continuous glucose monitoring in order to evaluate PPG contribution to hyperglycaemic exposure and to measure GV according to HbA1c levels.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

From March 2006 to December 2010, we prospectively included 72 overweight or obese (body mass index (BMI)  $> 25 \text{ kg/m}^2$ ) consecutive patients. Participants had no known glycaemic disorders or antidiabetic treatment. Participants were recruited from outpatients referred to our department for obesity. They were free of acute disease and were in stable condition. The study was proposed in order to assess the metabolic disorders associated to obesity.

Inclusion criteria were a BMI superior than  $25 \text{ kg/m}^2$  and age ranging from 18 to 70 years. Exclusion criteria were the following: presence of known diabetes or glucose intolerance, compulsive eating behavior or other eating disorders, syndromic causes of obesity, pregnancy, malignancies, anemia, respiratory failure, heart failure, kidney failure or hepatic failure and inability to control glycaemia. Participants with poor CGM recordings were also excluded. Recordings were considered of good quality when there were no missing data for the postprandial period and no more than 20 minutes of missing data at fasting/post-absorptive period. Participants gave informed consent and were admitted in the Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition of Jean Verdier hospital (day 0).

## 3. Methods

### 3.1. OGTT

The OGTT was performed in the morning of day 1 after a 12-hour fast. The test consisted of plasma glucose measurements at fasting and 120 minutes after drinking 75 g of anhydrous glucose dissolved in 200 ml of water within 5 minutes. The patients were asked to eat 250 g of jam in the afternoon (day 0) before the OGTT, in order to compensate a frequent carbohydrate restriction on the previous day [18]. According to American Diabetes Association (ADA) criteria, diabetes was

defined as a fasting plasma glucose  $\geq 7$  mmol/L (126 mg/dl) or a 2-hour plasma glucose  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dl) or both with the OGTT strategy [19]. Intermediate hyperglycemia was defined as impaired fasting glucose (fasting plasma glucose  $\geq 5.5$  mmol/L (100 mg/dl) and  $< 7$  mmol/L (126 mg/dl)) and/or impaired glucose tolerance (2-hour plasma glucose  $\geq 7.8$  mmol/L (140 mg/dl) and  $< 11.1$  mmol/L) with the OGTT strategy [19]. Dysglycemia was defined as intermediate hyperglycemia or diabetes. All the other biochemical measurements were performed on the same day.

### 3.2. Continuous glucose monitoring

The CGM device (Guardian RT, Medtronic, Northridge, CA) was placed on the morning of day 1 at least 2 hours before the OGTT. Interstitial glucose readings were validated with at least 3 to 4 capillary glucose measurements according to the manufacturer's guidelines. The 24-hour CGM recorded on day 1 from 00:00 to 24:00 was analyzed for each patient.

Patients were instructed not to have any physical activity, always use the hospital's elevators and during day 1 to remain inside their hospital room for 24 hours. The study period began at day 2 from 00:00 until 24:00, daily caloric intake was set at 1800 kcal and was divided in 3 meals with no snacks. The 1800 kcal diet represented approximately the mean daily basal energy expenditure previously calculated for the obese patients of our department [20]. A standardized breakfast (consisting of 200 ml of coffee or tea with no added sugar, 60 grams of bread, 30 grams of jam and 200 ml of orange juice) of 400 kcal was given, lunch and dinner contained 700 kcal respectively with 50% of carbohydrates, 15% of proteins and 35% of lipids.

### 3.3. PPG contribution and GV

CGM recordings were used to evaluate PPG contribution to the overall hyperglycemia and to measure GV. The areas under the curve (AUC) for 24 hours and 3 hours postprandially after breakfast, lunch and dinner were calculated from the CGM recordings. The remaining 15-hour CGM recording was considered as the sum of both post-absorptive and fasting periods [21]. The mean for 24-hour glucose expressed the mean "absolute" exposure to glucose. The AUC of a constant 5.5 mmol/L glucose concentration was subtracted from these AUCs, and the AUC difference was considered as "relative hyperglycemia". The 5.5 mmol/L glucose level was selected because it represented the cutpoint for defining IFG according to the ADA criteria. This upper limit of fasting glucose was a more sensitive cutpoint for describing the fasting glucose contribution in hyperglycemia in the non-diabetic range than the 6.1 mmol/L used in type 2 diabetes [6,7]. The percent of PPG contribution to the "relative hyperglycemia" was calculated for each quartile of HbA1c by the formula  $[100 \times (\text{post-prandial 3 hour AUC} - 3 \text{ h AUC for a constant } 5.5 \text{ mmol/L glycemia}) / (\text{total } 24 \text{ h AUC} - 24 \text{ h AUC for constant } 5.5 \text{ mmol/L glycemia})]$  as previously described [6]. Similarly, the percent of fasting/post-absorptive glucose contribution was estimated from the formula:  $[100 \times (\text{fasting/post-absorptive AUC} - \text{AUC for a constant } 5.5 \text{ mmol/L glycemia}) / (\text{total } 24 \text{ h AU} - 24 \text{ h AUC for constant } 5.5 \text{ mmol/L glycemia})]$

Twenty four hour CGM recordings from 00:00 to 24.0 were used and glycemic variability indices were calculated with the EasyGV® software [22]. MAGE calculations were not affected by the presence of hypoglycemic downstrokes since participants did not receive any treatment for diabetes [23]. The following glycemic variability indices were calculated: mean blood glucose (MBG), mean amplitude of glycemic excursions (MAGE), daily standard deviation of glucose value (SD), coefficient of variation (CV%), continuous overlapping net glycemic action (CONGA), J Index, high blood glucose index (HBGI) and low blood glucose index (LBGI), lability index (LI) and M value, and mean absolute glucose (MAG).

## 4. Biochemical measurements

Glucose value was measured on venous plasma by the glucose oxidase method (colorimetry, Kore Optima, Thermolab System, Paris La Défense, France). In order to prevent the degradation by the glycolysis enzymes from erythrocytes and leukocytes, blood samples were collected into a fluoro-oxalate tube (therefore containing anticoagulant inactivating glycolysis enzymes) and the centrifugation to separate blood fluid from blood cells was done within 15 minutes after the blood sampling. Regarding the precision of measurement of this technique, the intra-assay coefficient variation (repeatability) was 1% and the inter-assay coefficients of variation (reproducibility) were 1.4%/2.4% for normal (5.16 mmol/L) and pathological (17.10 mmol/L) values, respectively. Regarding the accuracy, internal controls (low and high levels of a Biorad control) were routinely daily performed.

HbA1c measurement was based on a turbidimetric inhibition immunoassay principle and total hemoglobin measurement on a modification of the alkaline hematin reaction (Dimension® Technology, Siemens Healthcare Diagnosis, Newark, DE) and HbA1c was expressed as a percentage of total hemoglobin and mmol/mol. The antibody that was used measured the hemoglobin variants that were glycosylated at the  $\beta$ -chain N-terminus on epitopes with the amino acid sequence VAL-HIS-LEU-THR including hemoglobin S, G, H, Wayne, E and C. No cross-reaction was found for the anti-HbA1c antibodies used in this kit with HbA0, HbA1a, HbA1b, acetylated hemoglobin, carbamylated hemoglobin, glycosylated albumin nor with labile HbA1c. The HbA1c results were standardized with the results obtained in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). This technique was certified by the US National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) based on the DCCT HbA1c measurement method [3]. Thus, our method could be certified as traceable as the DCCT method regarding its rigorous precision (recommended NGSP/DCCT-SFBC values of repeatability  $< 3\%$  and of reproducibility  $\leq 4\%$ ) and bias criteria. Our assay was also evaluated by the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) and was allowed to be commercialized in France. The intra-assay and inter-assay coefficient of variations were 1.3% and 1.2% respectively for normal whole blood sample (mean A1c 5.3% (34 mmol/mol)) and 1.5% and 2.3% respectively for elevated HbA1c level (mean A1c 8.6% (70 mmol/mol)). Regarding reliability, internal controls (low and high levels of a Biorad control)

were routinely daily performed. Finally, regarding the accuracy of measurement, the glucose determination as well as all biochemical parameters (including HbA1c analysis) performed in the biochemistry laboratory are bi-annually evaluated by national (external) quality control surveys.

Serum insulin was measured with the Luminescent Immuno-logic Assay (DPC, Los Angeles, CA) and insulin resistance Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) index was calculated [24]. Insulin resistance was evaluated by the Homeostasis Model Assessment (HOMA) index and the Matsuda index [25]. The following measurements were also performed: total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides (enzymatic colorimetry, Hitachi 912, Roche Diagnostic, Meylan, France). Low density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated using the Friedwald formula, no participants had triglyceride levels superior to 400 mg/dl.

## 5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the SPSS statistical software (version 13.0, Chicago, IL). Variables were expressed as means  $\pm$  SD or as percentages. The Pearson correlation coefficient was used to measure associations between continuous variables. Patients in HbA1c quartiles (Q1 to Q4) were compared with analysis of variance when variances were homogenous. The Bonferroni correction for multiple testing was used for post-hoc analyses. When the variances were not homogeneous even after transformation, we used the Mann-Whitney U test. The chi square test was used for categorical variables. The fact that two patients with poor quality CGM recordings were excluded from the analysis, rendered the analysis "on treatment" and not "intention-to-treat".

The estimated minimum sample size for a two-tailed hypothesis was calculated at 15 persons per group (Q1 to Q4) in order to obtain a statistical power of 80% and a probability level at 0.0125 with an anticipated effect size estimated at 1.3 for PPG contribution to "relative" hyperglycemia between HbA1c (%) quartiles. The total number of at least 72 patients (18 subjects in each group) was decided in order to overcome unequal distributions of HbA1c due to the unpredicted nature of the consecutive inclusions or the presence of missing data. The power of the study was not affected by the exclusion of 2 patients with poor quality CGM recordings since at the end of the study we disposed in all quartiles more subjects than the predefined number. Although we cannot formally exclude the presence of bias, the impact of missing data should be minimal since they represented 2.8% of the whole data set and that is why we think that "on treatment" and "intention-to-treat" analyses would lead to similar results.

## 6. Results

### 6.1. Patients' characteristics in the total cohort and by HbA1c quartiles

Seventy-two patients were included, two patients did not have good quality of CGM recordings, both of these patients had more than 20 minutes of missing data at fasting/post-

absorptive period and were excluded from the study. The characteristics for the 70 patients considered for analysis are summarized in Table 1. According to the OGTT, one patient had IFG, one had IGT and IFG, 22 had IGT and 13 had diabetes. As expected, the rate of glycemic disorders increased significantly from the first to the fourth HbA1c quartile (from Q1 to Q4). Age, HbA1c, fructosamine, fasting and 2-hour plasma glucose increased significantly across HbA1c quartiles. There were no race/ethnicity differences between HbA1c quartiles (European/North African/Sub-Saharan African,  $p = 0.332$ ).

### 6.2. PPG contribution

The mean 24-hour glucose AUC represented a mean indicator of the glycemic exposure that increased from Q1 to Q4 ( $p < 0.0001$ , Fig. 1A). The sum of the 24 hour "relative" hyperglycemia AUC, was considered as an absolute indicator of the hyperglycemic exposure, increased from Q1 to Q4 ( $p < 0.001$ ), as shown for fasting/post-absorptive and postprandial AUCs in Fig. 1C. There was a 17-fold increase in fasting/post-absorptive ( $p < 0.001$ ) and a 7-fold increase in postprandial AUC from Q1 to Q4 ( $p < 0.001$ ). Fasting/post-absorptive relative hyperglycemic AUC markedly increased from Q3 to Q4 and its value in Q4 became greater than the Q3 postprandial AUC ( $p < 0.001$ , Fig. 1C). The contribution of postprandial period to "relative" hyperglycemia decreased from Q1 to Q4 ( $81.2 \pm 3\%$ ,  $66 \pm 6\%$ ,  $65.8 \pm 7.5\%$ ,  $57 \pm 12\%$   $p < 0.05$ ) (Fig. 1D), Q4 fasting and Q4 PPG were significantly different ( $p < 0.001$ ).

### 6.3. Glycemic variability

Table 2 shows that increasing HbA1c quartiles were associated with all glycemic variability indices, except LBGI, M-value and MAG. MAGE highly correlated with other indices like SD ( $r = 0.901$ ,  $p < 0.001$ ), CV% ( $r = 0.890$ ,  $p < 0.001$ ), LI ( $r = 0.918$ ,  $p < 0.001$ ), J Index ( $r = 0.747$ ,  $p < 0.001$ ), HbG1 ( $r = 0.857$   $p < 0.001$ ). HbA1c correlated with 24-hour mean CGM glucose values ( $r = 0.572$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2A inset). MAGE correlated with HbA1c (Fig. 2A) and increased according to glycemic status ( $1.9 \pm 0.75$ ,  $3.5 \pm 1.4$  and  $5.6 \pm 2.3$  for patients with normoglycemia, intermediate hyperglycemia and diabetes, respectively;  $p < 0.001$ ) (Fig. 2B).

## 7. Discussion

Our results show for the first time with the use of continuous glucose monitoring in a series of overweight/obese patients with no known glycemic disorders representing the glycemic continuum from normal glycemia to newly diagnosed diabetes that PP contribution to overall hyperglycemia decreased as HbA1c increased, as it has been shown in patients with type 2 diabetes [14]. Our study confirmed previously published papers reporting that the loss of postprandial glycemic control precedes the deterioration of fasting glycemia, even before the appearance of diabetes. Glycemic variability increased also with the appearance of dysglycemia and the concurrent increase of HbA1c.

**Table 1 – Patient's characteristics by HbA1c quartiles.**

	Total (n = 70)	Quartiles of HbA1c			Q4 (n = 16)	p
		Q1 (n = 16)	Q2 (n = 22)	Q3 (n = 16)		
HbA1c (% min-max)	5.1-7.4	5.1-5.5	5.6-5.9	6.0-6.2	6.3-7.4	<0.001
HbA1c (mmol/mmol) min-max	32-57	31-37	38-41	42-44	45-57	<0.001
HbA1c (% mean)	5.9 ± 0.5	5.3 ± 0.1†,‡	5.8 ± 0.1‡	6.1 ± 0.1‡	6.6 ± 0.2	<0.001
HbA1c (mmol/mmol) mean	41 ± 2.5	34 ± 0.5†,‡	40 ± 0.5‡	43 ± 0.5‡	49 ± 1.0	<0.001
Gender (female/male)	62/8	14/2	17/5	16/0	15/1	0.173
Age (years)	46.5 ± 14.3	36.2 ± 11.7†,‡	46.1 ± 13.4	51.1 ± 14.8	52.5 ± 12.5	0.003
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	35.2 ± 6.8	37.2 ± 7.6	33.7 ± 6.7	34.3 ± 6.3	36.1 ± 6.4	0.390
Waist circumference (cm)	104.1 ± 13.6	104.2 ± 13.3	104.4 ± 13.7	105.3 ± 14	102.6 ± 14.7	0.964
Fructosamine (µmol/L)	217.6 ± 27.2	200.4 ± 18.4‡	217.1 ± 27.6	220.4 ± 20.4	232.6 ± 31.7	0.007
Total cholesterol (mmol/L)	5.2 ± 0.8	5.2 ± 1.0	5.1 ± 0.7	5.2 ± 0.8	5.4 ± 0.9	0.646
LDL cholesterol (mmol/L)	3.4 ± 0.8	3.5 ± 0.9	3.2 ± 0.6	3.2 ± 0.7	3.5 ± 0.8	0.309
Triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 0.8	1.4 ± 0.6	1.9 ± 1.0	1.8 ± 1.2	1.6 ± 0.5	0.310
HDL cholesterol (mmol/L)	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3	0.352
Urinary albumin excretion rate (mg/24 h)	13.6 ± 14.6	17.6 ± 14.4	19.1 ± 24	11.6 ± 7.2	6.8 ± 3.8	0.268
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.2 ± 0.7	4.8 ± 0.6‡	5.1 ± 0.4‡	5.2 ± 0.6‡	6.0 ± 0.9	<0.001
2 h CGTT plasma glucose (mmol/L)	8.3 ± 2.4	6.9 ± 1.6‡	7.8 ± 2.1‡	8.7 ± 2.2	10.2 ± 2.6	<0.001
Insulin (pmol/L)	88.5 ± 57.6	78.7 ± 26.2	71.7 ± 48.8	115.3 ± 87.4	96.5 ± 47.5	0.118
HOMA-IR	1.6 ± 2.0	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.9	2.1 ± 1.5	1.8 ± 0.9	0.103
Metsuda index	5.6 ± 3.4	5.9 ± 2.0	6.7 ± 4.1	5.1 ± 3.7	4.0 ± 2.1	0.066
Glucose tolerance (normal/IFG/IGT/PG and IGT/diabetes)	33/1/2/1/13	12/0/4/0/0	13/0/8/0/1	6/0/7/0/3	2/1/3/1/9	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	121.2 ± 15	119.4 ± 13.2	117.5 ± 15.5	125.2 ± 15.7	124.4 ± 14.9	0.336
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.9 ± 9.8	73.7 ± 6.8	68.6 ± 9.8	75.1 ± 11.6	67.3 ± 8.8	0.056
Metabolic syndrome (no/yes)	25/45	7/8	8/15	4/12	6/10	0.734

Data are presented as mean ± SD. HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; OGTT: oral glucose tolerance test; Q: quartile. Metabolic syndrome was defined according to the 2009 International Diabetes Federation (IDF) criteria.

The p value refers to the ANOVA for the groups of HbA1c quartiles, multiple comparisons after Bonferroni adjustment for ANOVA. when this sign \* is present the difference of the HbA1c quartile is significant (p < 0.05) when compared to Q2, †p < 0.05 vs Q3, ‡p < 0.05 vs Q4.

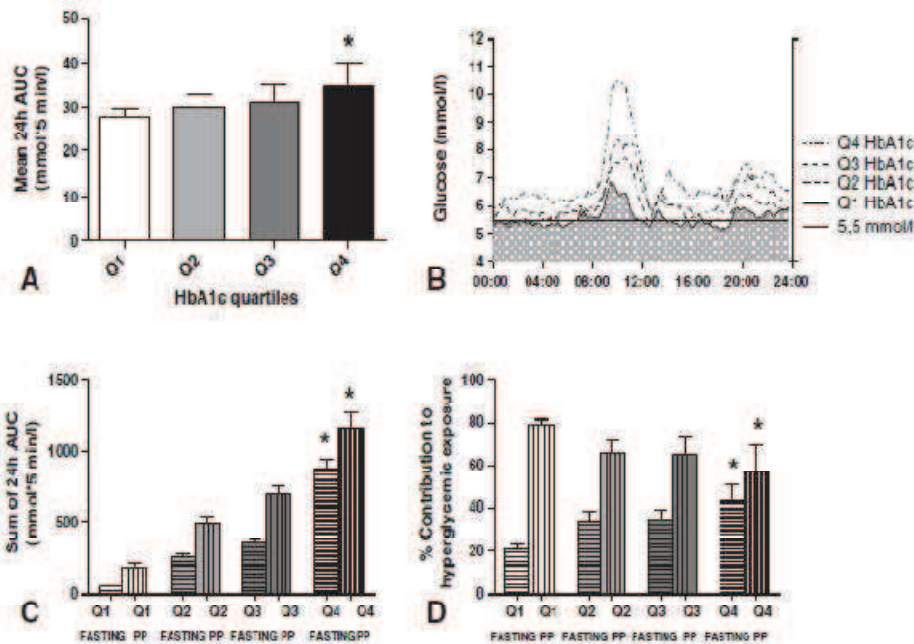
The prevalence of glycemic disorders was increased in our cohort (more than 50%), even more than previously reported in our department [26,27] which was probably due to a recruitment bias related to the inclusion of participants with higher risk of diabetes. The prevalence of hyperglycemic disorders increased from Q1 to Q4 with 9 out of the 13 patients with newly diagnosed diabetes detected by OGTT being in Q4 (HbA1c range: 6.3-7.4%, 45-57 mmol/mmol). HbA1c differences although significant are small and we cannot exclude the presence of nonglycemic factors of HbA1c modulation that are genetically [28] or otherwise determined [29] and might explain these results. It has also been shown that the variability in blood glucose among individuals with lower HbA1c levels of 5.7-6.4% was significant [30].

The role of postprandial glycemic excursions has already been studied in type 2 diabetic patients for whom the contribution of postprandial period decreased from the lowest to the highest levels of HbA1c [6]. Our results suggested the same phenomenon: in obesity, total AUC, reflecting the absolute glycemic exposure, increased for both fasting/post-absorptive and postprandial periods of time, resulting in an increase especially in the highest HbA1c quartile where fasting AUC was greater than the Q3 postprandial AUC. An important finding was that in patients without known glucose metabolism disorders, the postprandial contribution to the "relative" hyperglycemia was always greater than fasting/post-absorptive contribution: in the same quartile of HbA1c: the contribution of the postprandial period to a "relative hyperglycemia" started

from 81.2% in the first quartile of HbA1c and decreased to 57% in the highest quartile while fasting glucose increased. This result suggests as previously published that even before the onset of diabetes, failure to keep a normal postprandial glycemia will result in fasting hyperglycemia [31]. Similarly, a loss of postprandial glycemic control was shown to precede the deterioration of fasting glycemia in patients with poorly controlled type 2 diabetes [14]. FPG remained the main contributor of "relative hyperglycemia" in all quartiles, the wide range of HbA1c in Q4 and the presence of a small sample did not allow us to establish a cutoff value.

The potential consequences of a "relative" postprandial glycemia excess are supported by many epidemiological studies that have shown that 2-hour post-challenge glucose levels can predict cardiovascular disease [8,32-35] and by a pharmacological intervention based on acarbose in IGT subjects which prevented the progression to diabetes and was associated with a significant reduction of cardiovascular outcomes [36]. Altogether these data suggest that interventions dealing with postprandial glycemia control should be implemented earlier in order to prevent diabetes and improve cardiovascular prognosis.

One of our main findings was that in a range of HbA1c 5.1-7.4% (32-57 mmol/mmol) higher HbA1c was associated with a greater CV. However CV indices remained lower than in patients with type 2 diabetes [11]. Monnier et al. have reported that MAGE was associated with free radical production whereas PPG area under the curve was not [11]. A recent study in type 1



**Fig. 1 – Results of the 24-hour continuous glucose monitoring.** (A) Mean 24-hour glucose exposure: the 24-hour glucose area under the curve (24 h AUC) increased significantly from first to fourth quartiles of HbA1c (Q1 to Q4)  $p < 0.001$ . (B) 24-hour continuous glucose monitoring (CGM) recordings by HbA1c quartiles. Glucose values greater than 5.5 mmol/L were considered to calculate hyperglycemic AUCs. (C) Sum of the 24 hour AUC superior to a glucose concentration of 5.5 mmol/L denoting the absolute hyperglycemic exposure during fasting/post absorptive (FASTING) and during the 3 hour postprandial period (PP) by HbA1c quartiles ( $p < 0.001$ ). (D) Relative contribution of fasting/post-absorptive (FASTING) and post-prandial (PP) periods to hyperglycemic exposure according to HbA1c quartiles ( $p < 0.05$ ).

diabetic patients has added proof to the role of GV by showing that hyperglycemia following a 2-hour induced hypoglycemia worsened endothelial function and increased oxidative stress [12]. There are few data for patients with normoglycemia. A recent study that compared abdominally and non-abdominally obese men found a significant GV increase in the first group [37]. In early type 2 diabetes the use of intensive insulin treatment reduced GV and improved  $\beta$ -cell function [38]. The role of GV in  $\beta$ -cell function in the case of normoglycemia or slight

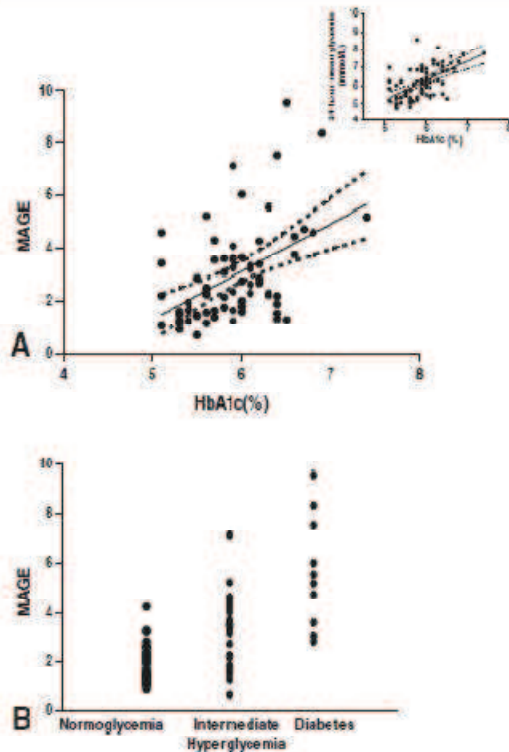
hyperglycemia in obese patients is not known but in our study HbA1c quartiles presented no differences in  $\beta$ -cell Homeostasis Model Assessment (HOMA) confirming the data published by Ebenibo et al. [29]. Every index presents GV in a different way. MAGe has the advantage to describe major fluctuations and is highly correlated with SD, SD and %CV are simple, more intuitive statistical variables that can be easily calculated and interpreted. HbG1 estimates better severe hyperglycemic values, J Index combines mean and SD and is correlated with

**Table 2 – Glycemic variability indices in the total cohort and by HbA1c quartiles.**

	Total n = 70	Quartiles of HbA1c			Q4 (n = 15)	p
		Q1 (n = 16)	Q2 (n = 22)	Q3 (n = 16)		
Mean blood glucose (mmol/L)	6.2 ± 0.9	5.6 ± 0.6*	6.0 ± 0.9‡	6.2 ± 0.6‡	6.9 ± 0.8	<0.001
Mean amplitude of glycemic excursions (MAGE) (mmol/L)	2.9 ± 1.8	1.8 ± 1.0††	2.9 ± 1.4	2.9 ± 1.3	4.1 ± 2.6	0.002
Standard deviation glucose (mmol/L)	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.4††	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.8	<0.001
Coefficient of variation (CV%)	18.6 ± 8.7	15.4 ± 6.4††	17.4 ± 6.3	21.7 ± 9.7	22.6 ± 11.1	0.007
Continuous overlapping net glycaemic action (CNGA)	5.7 ± 0.8	5.1 ± 0.5‡	5.5 ± 0.8‡	5.7 ± 0.6‡	6.4 ± 0.7	<0.001
J Index	18.1 ± 6.8	13.3 ± 3.6‡	16.7 ± 5.6‡	18.9 ± 5.1	24.3 ± 7.8	<0.001
High blood glucose index (HbG1)	1.7 ± 1.7	0.7 ± 0.7‡	1.4 ± 1.4‡	2.2 ± 1.5	2.8 ± 2.2	0.001
Lability index (LI)	0.8 ± 0.7	0.4 ± 0.4‡	0.6 ± 0.5‡	0.8 ± 0.6	1.3 ± 0.9	0.011
Low blood glucose index (LBGI)	1.5 ± 1.1	1.6 ± 1.0	1.4 ± 1.0	1.9 ± 1.6	1.0 ± 0.7	0.174
M-Value	2.2 ± 1.8	2.0 ± 1.5	2.0 ± 1.3	2.5 ± 2.5	2.4 ± 2.1	0.798
Mean absolute glucose (MAG)	0.9 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.4	0.267

Data are mean ± SD. The p value refers to the ANOVA for the groups of HbA1c quartiles.

Multiple comparisons after Bonferroni adjustment for ANOVA: \* $p < 0.05$  vs Q2, † $p < 0.05$  vs Q3, ‡ $p < 0.05$  vs Q4.



**Fig. 2 – Correlation between MAGE and HbA1c, and glycemic status. (A) Correlation between HbA1c and mean amplitude of glucose excursions (MAGE) in the inset correlation of the mean 24 hour glycemia and HbA1c ( $p < 0.001$ ). (B) MAGE according to glycemic status ( $p < 0.001$ ).**

the percentage of time in target range [23]. In our population these indices increased significantly with increasing levels of HbA1c. Oxidative stress and endothelial dysfunction related to GV might contribute to impaired cardiovascular prognosis in prediabetic patients as suggested by their enhancement during OGTT in healthy individuals [39]. Our patients with higher HbA1c also had a higher daily mean glucose level on CGM which indicated a greater glucose exposure [40].

Little is known about the clinical relevance for the presence of comorbidities related to the GV indices in prediabetic states. In a recent study, no correlation was found between carotid intima-media thickness and MAGE [37]. These findings may be partly attributed to the young age of the participants and to the relatively small amplitude of MAGE in comparison to patients with newly diagnosed type 1 or type 2 diabetes. There is accumulating evidence for the relationship between peripheral neuropathy and impaired glucose tolerance. The main pathogenetic mechanisms are likely to result from postprandial hyperglycemia that provides a repetitive low amplitude stress able to predispose to precocious complications [41]. Increased postprandial glycemia in individuals with impaired glucose tolerance is also independently associated with the traditional microvascular complications like retinopathy [42]. However, the respective vascular consequences of greater GV and glucose exposure in obese patients need to be studied in large scale studies. Other

studies using 7-point self measured blood glucose profiles failed to identify similar associations between GV and vascular events in diabetic patients [43,44]. However, such data did not allow safe conclusions since the estimated minimum interval between glucose measurements from which GV can be consistently assessed was one hour for MAGE and longer intervals were associated with a greater systematic change in MAGE [45].

In the current study CGM was used to evaluate fasting/post-absorptive and PPG contribution to “relative” hyperglycemia and glucose fluctuations, a method that provides adequate information for both states. A limitation of our study was the small sample size, the on treatment analysis, the fact that we cannot exclude a selection bias and that we could analyze the mean glucose exposure and GV only on a 24 hour CGM and therefore the repeatability of our findings could not be tested. Additionally there was no adjustment for caloric intake according to the individual daily needs during the CGM recordings and our results came from overweight/obese populations and should be validated in the general population with lower BMIs. A strong point of this study was that we used standardized conditions for physical activity and caloric intake, two factors that can greatly influence glucose levels. Hypoglycemic events did not occur as opposed to treated diabetic patients with strict treatment objectives, and MAGE calculations were not affected by the presence of hypoglycemic downstrokes [23].

In conclusion, using for the first time CGM recordings in a population of overweight/obese subjects not known to have glycemic disorders, we confirm that PPG is the main contributor to “relative” hyperglycemia. We show that this phenomenon is true in a range of HbA1c from 5.1% to 7.4% (32–57 mmol/mol). The HbA1c quartiles were associated with: a stepwise decrease of postprandial contribution to a “relative” hyperglycemia, and to greater GV. The role of GV in the development of cardiovascular complications remains to be established in future studies in the general population. The present findings support the importance of postprandial period in glycemic exposure even before the appearance of diabetes and the relevance of postprandial control as primary target in diabetes prevention.

#### Author contributions

MF. wrote the manuscript, researched data, and performed the statistic analyses; E.C. directed research, contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript. I.B., R.D. and C.C. recruited patients, performed CGM recordings and contributed to discussion; P.V. directed research, designed the study, recruited patients, contributed to discussion, reviewed and edited the manuscript.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.006>.

## REFERENCES

- [1] International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327-34.
- [2] Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000;321:405-12.
- [3] Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, et al. The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report. *Clin Chem* 2001;47:1985-92.
- [4] Ollerton RL, Playle R, Ahmed K, et al. Day-to-day variability of fasting plasma glucose in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 1999;22:394-8.
- [5] Standards of medical care in diabetes — 2013. *Diabetes Care* 2013;36(Suppl. 1):S11-66.
- [6] Monnier L, Lapinski H, Colette C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA(1c). *Diabetes Care* 2003;26:881-5.
- [7] Monnier L, Colette C, Owens DR. Glycemic variability: the third component of the dysglycemia in diabetes. Is it important? How to measure it? *J Diabetes Sci Technol* 2008;2:1094-100.
- [8] Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. *European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology. Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet* 1999;354:617-21.
- [9] Brownlee M, Hirsch IB. Glycemic variability: a hemoglobin A1c-independent risk factor for diabetic complications. *JAMA* 2006;295:1707-8.
- [10] Hirsch IB, Brownlee M. Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control? *J Diabetes Complications* 2005;19:178-81.
- [11] Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006;295:1681-7.
- [12] Ceriello A, Novials A, Ortega E, et al. Evidence that hyperglycemia after recovery from hypoglycemia worsens endothelial function and increases oxidative stress and inflammation in healthy control subjects and subjects with type 1 diabetes. *Diabetes* 2012;61:2993-7.
- [13] U.K. Prospective Diabetes Study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 1995;44:1249-58.
- [14] Monnier L, Colette C, Dunseath GJ, Owens DR. The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:263-9.
- [15] Pratley RE, Weyer C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:929-45.
- [16] Kanat M, Norton L, Winnier D, et al. Impaired early- but not late-phase insulin secretion in subjects with impaired fasting glucose. *Acta Diabetol* 2011;48:209-17.
- [17] Reaven GM, Brand RJ, Chen YD, et al. Insulin resistance and insulin secretion are determinants of oral glucose tolerance in normal individuals. *Diabetes* 1993;42:1324-32.
- [18] Paulweber B, Valensi P, Lindstrom J, et al. A European evidence-based guideline for the prevention of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2010;42(Suppl. 1):S3-S36.
- [19] Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34(Suppl. 1):S62-9.
- [20] Valensi P, Lormeau B, Dabbech M, et al. Glucose-induced thermogenesis, inhibition of lipid oxidation rate and autonomic dysfunction in non-diabetic obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:494-9.
- [21] Monnier L, Colette C, Lapinski H, Boniface H. Self-monitoring of blood glucose in diabetic patients: from the least common denominator to the greatest common multiple. *Diabetes Metab* 2004;30:113-9.
- [22] Hill NR, Oliver NS, Choudhary P, Levy JC, et al. Normal reference range for mean tissue glucose and glycemic variability derived from continuous glucose monitoring for subjects without diabetes in different ethnic groups. *Diabetes Technol Ther* 2011;13:921-8.
- [23] Rodbard D. Interpretation of continuous glucose monitoring data: glycemic variability and quality of glycemic control. *Diabetes Technol Ther* 2009;11(Suppl. 1):S55-67.
- [24] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
- [25] DeFronzo RA, Matsuda M. Reduced time points to calculate the composite index. *Diabetes Care* 2010;33(7):e93.
- [26] Cosson E, Chiheb S, Hamo-Tchatchouang E, et al. Use of clinical scores to detect dysglycemia in overweight or obese women. *Diabetes Metab* 2012;38:217-24.
- [27] Cosson E, Nguyen MT, Hamo-Tchatchouang E, et al. What would be the outcome if the American Diabetes Association recommendations of 2010 had been followed in our practice in 1998-2006. *Diabet Med* 2011;28(5):567-74.
- [28] An P, Miljkovic I, Thyagarajan B, Kraja AT, et al. Genome-wide association study identifies common loci influencing circulating glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in non-diabetic subjects: the Long Life Family Study (LLFS). *Metabolism* 2014;63(4):461-8.
- [29] Eberibo S, Edeoga C, Wan J, Dagogo-Jack S. Glucoregulatory function among African Americans and European Americans with normal or pre-diabetic hemoglobin A1c levels. *Metabolism* 2014;63(6):767-72.
- [30] Nathan DM, Kuenen J, Fau-Borg R, et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31(8):1473-8.
- [31] Bock G, Dalla Man C, Campioni M, et al. Pathogenesis of pre-diabetes: mechanisms of fasting and postprandial hyperglycemia in people with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2006;55:3536-49.
- [32] Donahue RP, Abbott RD, Reed DM, Yano K. Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry. Honolulu Heart Program. *Diabetes* 1987;36:689-92.
- [33] de Vegt F, Dekker JM, Ruhe HG, et al. Hyperglycemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 1999;42:926-31.
- [34] Balkau B, Shipley M, Jarrett RJ, et al. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged nondiabetic men. 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study. *Diabetes Care* 1998;21:360-7.
- [35] Meigs JB, Nathan DM, D'Agostino Sr RB, Wilson PW. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002;25:1845-50.
- [36] Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, et al. Acarbose for the prevention of type 2 diabetes, hypertension and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: facts and interpretations concerning the critical analysis of the STOP-NIDDM Trial data. *Diabetologia* 2004;47:969-75.
- [37] Ma CM, Yin FZ, Wang R, Qin CM, et al. Glycemic variability in abdominally obese men with normal glucose tolerance as assessed by continuous glucose monitoring system. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:1616-22.



- [38] Kramer CK, Fao Choi H, Zinman B, et al. Glycemic variability in patients with early type 2 diabetes: the impact of improvement in beta-cell function. *Diabetes Care* 2014;37(4):1116-23.
- [39] Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002;106:1211-8.
- [40] Selvin E, Steffes MW, Zhu H, et al. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N Engl J Med* 2010;362:800-11.
- [41] Papanas N, Ziegler D. Polyneuropathy in impaired glucose tolerance: is postprandial hyperglycemia the main culprit? A mini-review. *Gerontology* 2013;59:193-8.
- [42] Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2003;52:2867-73.
- [43] Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:1486-90.
- [44] Siegelar SE, Kerr L, Jaccber SJ, Devries JH. A decrease in glucose variability does not reduce cardiovascular event rates in type 2 diabetic patients after acute myocardial infarction: a reanalysis of the HEART2D study. *Diabetes Care* 2011;34:855-7.
- [45] Baghurst PA, Rodbard D, Cameron FJ. The minimum frequency of glucose measurements from which glycemic variation can be consistently assessed. *J Diabetes Sci Technol* 2010;4:1382-5.

### 3.1.3 Comparaison de la cinétique glycémique entre un petit déjeuner standardisé et une charge orale en glucose

#### Poster SFD 2012

##### 3.1.3.1 Influence d'un repas mixte *versus* influence d'une charge orale en glucose

Evaluer les effets de la prise alimentaire globale est plus physiologique qu'évaluer ceux induits par une charge en glucose isolée. Une étude canadienne a montré qu'il y avait une bonne corrélation entre la glycémie et l'insulinémie post-prandiales et deux heures après charge en glucose [492]. Dans cette étude la consommation de 87 g (345 kcal) de biscuits comprenant 10,7 g de graisses, 12,1 g de protéines, 8,9 g de sucres simples, 41,1 g d'amidon, 3,8 g de fibres a été comparée à une charge standard de 75 g de glucose. Il y avait une différence dans les concentrations d'insuline et de glucose entre les deux tests à deux heures mais les coefficients de corrélation étaient très bons pour les deux paramètres ( $r=0,97$ ). En outre, en pratiquant des dosages glycémiques très rapprochés, notre équipe a montré récemment que le pic post-prandial de glucose était un bon prédicteur de la réponse glycémique globale au repas [493].

Chez des sujets normaux, les concentrations sanguines de glucose, lipides et insuline augmentent après chaque repas de façon soutenue. Ces modifications sont très probablement d'une importance capitale dans le processus d'initiation de l'athérosclérose et dans son développement. Par exemple, la charge orale non seulement en glucose mais aussi en graisses induit une augmentation du stress oxydatif, comme montré par une augmentation des concentrations sériques de nitrotyrosine, et une diminution de la fonction endothéliale périphérique chez des sujets sains et des diabétiques de type 2 [494]. Par ailleurs, il a été montré qu'une charge en glucose augmentait la pression artérielle des diabétiques hypertendus [495]. Dans un travail précédent, notre équipe a comparé les modifications hémodynamiques induites par la charge orale en glucose et par un repas mixte incluant 50% d'hydrates de carbone chez des sujets sains ; L'apport oral de glucose était suivi d'une augmentation légère (5 mmHg en moyenne) de la PA systolique et d'une accélération significative de la fréquence cardiaque qui étaient associées à une augmentation significative de la concentration plasmatique de noradrénaline et à une modification de la balance vago-sympathique en faveur d'une prédominance sympathique. A contrario, un repas mixte n'était pas associé à des changements hémodynamiques significatifs [496].

### 3.1.3.2 Etude de la glycémie post prandiale utilisant un holter glycémique. HGPO versus petit déjeuner standardisé

Parmi les 70 participants de l'étude de la glycémie post prandiale utilisant un holter glycémique, 53 ont eu les enregistrements CGM pendant une HGPO et un petit déjeuner standardisé.

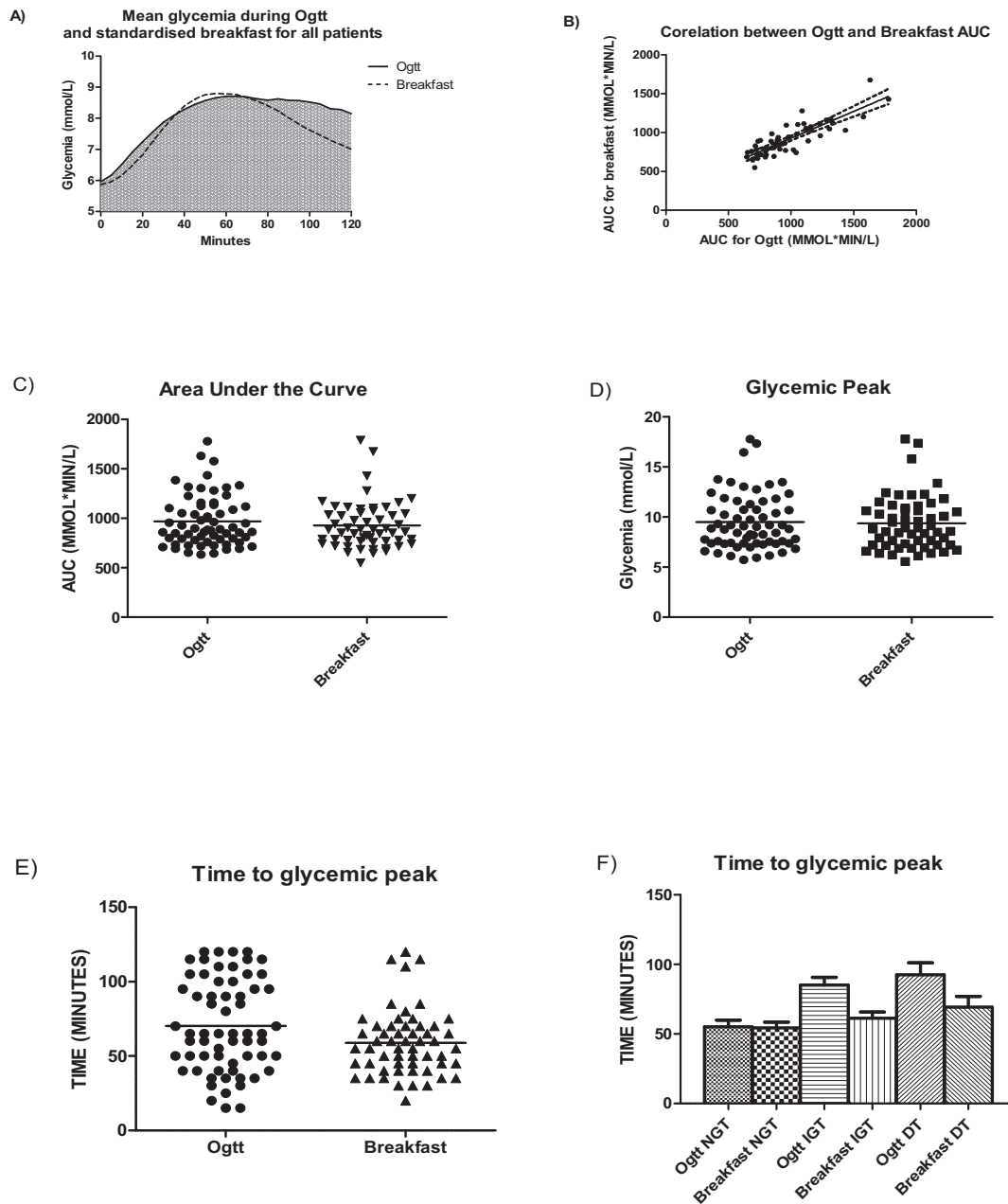
Le petit déjeuner standardisé était constitué de 200 ml de café ou de thé sans sucre ajouté, 60 grammes de pain, 30 grammes de confiture et de 200 ml de jus d'orange. Il apportait 75 g de glucides et au total 400 kcal.

Notre objectif était de comparer et d'étudier la cinétique du glucose interstitiel pendant la période post prandiale suivant le petit déjeuner standardisé et suivant la prise de 75 g de glucose.

### 3.1.3.3 Résultats HGPO vs petit déjeuner standardisé.

Les 53 patients se répartissaient en 26 normoglycémiques (NGT), 20 intolérants au glucose (IGT) et 7 diabétiques (DT2) selon les résultats de l'HGPO.

L'aire sous courbe du glucose au cours des 2 heures suivant le petit déjeuner et l'HGPO étaient fortement corrélées ( $R^2 = 0,504$ ,  $p < 0,0001$ , **Figure 21**), l'AUC sur 120 minutes et le pic glycémique au cours des deux tests n'étaient pas statistiquement différents ( $p = 0,075$  et  $p = 0,371$ , **Figure 21: C et D**). Le temps nécessaire pour atteindre le pic glycémique était plus long pour l'HGPO ( $70,1 \pm 30,8$  vs  $59 \pm 22$  minutes,  $p = 0,020$ ). Cette différence était due à un temps plus long chez les IGT et les DT2 (NGT :  $56,3 \pm 27,5$  minutes vs  $85,2 \pm 25,5$  minutes,  $p < 0,001$  pour les IGT vs  $92,5 \pm 24,6$  minutes pour DT2,  $p < 0,01$ ). Le délai du pic suivant le petit déjeuner glycémique ne différait pas significativement entre les 3 groupes (NGT / IGT / DT2,  $p = 0,207$ ). Les taux de glucose à 120 minutes étaient significativement plus élevés lors de l'HGPO par rapport au petit déjeuner standardisé ( $p < 0,0001$ ), pour tous les groupes NGT ( $6,5 \pm 0,9$  vs  $5,98 \pm 0,9$ ,  $p < 0,025$ ), IGT ( $8,9 \pm 1,7$  vs  $7,2 \pm 1,9$ ,  $p < 0,0002$ ), DT2 ( $12,6 \pm 2,3$  vs  $10,2 \pm 1,9$ ,  $p < 0,03$ ).



**Figure 21:** Comparaison des enregistrements CGM après HGPO (OgTT) et petit-déjeuner  
 A : moyennes glycemiques pour tous les patients, B : corrélation de l'AUC après le petit déjeuner et HGPO ( $\beta = 0701$ ,  $p < 0,0001$ ), C comparaisons des AUC ( $p = 0,075$ ), D : comparaison de pic glycémique ( $p = 0,371$ ), E : délai du pic glyccémiaue ( $p = 0,020$ ), F : le délai du pic glycémique pour NGT / IGT / DT2, HGPO diffère de manière significative entre les 3 groupes ( $p = 0,0001$ ) ; Il ne diffère pas après le petit déjeuner entre les 3 groupes.

### 3.1.3.4 Discussion

Un certain nombre de facteurs peuvent avoir un impact sur les glycémies post charge en glucose. Malgré cela dans le cadre de dépistage précoce de troubles du métabolisme glucidique, les mesures glycémiques 2 heures après prise orale du glucose sont utilisées comme un marqueur de substitution de l'hyperglycémie post-prandiale.

La vidange gastrique de repas liquides, tels que la solution de 300 ml lors de l'HGPO, est beaucoup plus rapide que celle d'un repas solide, générant de ce fait une entrée rapide non-physiologique de glucose dans le duodénum et, par la suite, dans la circulation portale [497]. Le contenu des repas en protéines et en graisses retarde l'absorption intestinale de glucose, et génère ainsi des excursions glycémiques postprandiales moins marquées [498]. La sécrétion d'incrétines, tels que le GIP et le GLP-1, est plus rapide et plus prononcée après une HGPO qu'après l'ingestion d'un repas mixte [499].

Les glycémies capillaires au cours d'une HGPO et suite à un repas mixte dans des conditions de la "vraie vie" sont corrélés même si les glycémies après l'HGPO sont nettement plus élevées [500].

Nos résultats montrent que la cinétique du glucose après une HGPO et le petit déjeuner standardisé ne présente aucune différence pour le AUC sur 120 minutes ni pour le pic glycémique, mais qu'il existe des différences pour le temps nécessaire pour atteindre le pic glycémique chez les patients IGT et DT2 pour les quels le délai du pic est plus long lors de l'HGPO.

L'HGPO avec 75 g de glucose est utilisée comme outil diagnostique de l'intolérance au glucose (glycémie 2 heures  $\geq 7.8$  mmol/L) ou la présence du diabète (glycémie  $\geq 11,1$  mmol/L). Ce test est plus sensible que la glycémie à jeun [501] pour détecter le diabète asymptomatique. Toutefois, la valeur de la HGPO est discutable, car ce test est perçu comme difficile, coûteux, complexe et prenant du temps. D'autre part le test est désagréable et il a une mauvaise reproductibilité [502]. Une étude pilote sur 10 sujets non diabétiques a montré qu'un repas standardisé induisait une réponse mesurée par les glycémies capillaires moins variable que l'HGPO [503]. Une autre étude a comparé la variabilité intra-sujet des concentrations plasmatiques de glucose mesurée 2 h après l'HGPO vs un repas standardisé solide. Les concentrations plasmatiques de glucose mesurées 2 heures après le repas standardisé étaient corrélées à celles mesurées 2 h après l'HGPO, mais étaient plus reproductibles que les glycémies 2 h post-charge seulement dans la population IGT [492].

La reproductibilité et la tolérance après une HGPO a été comparée avec des volumes de dilution de 300, 600 et 900 ml (75 g de glucose). Les auteurs avaient conclu que la dilution de 75 g de glucose permettait d'améliorer la tolérance globale, mais pas la reproductibilité [504].

A noter que tous les participants dans l'étude ont très bien toléré la prise du petit déjeuner standardisé qui ressemble à un petit déjeuner français.

L'HGPO également provoque une réponse glycémique à 120 minutes plus importante par rapport à un déjeuner confirmant les résultats des études antérieures [492]. Ce type de réponse pourrait être expliqué par le fait qu'une partie des glucides est sous forme liquide dans le petit déjeuner (200 ml de jus d'orange).

### **3.1.3.5 Conclusion**

Nos résultats avec l'utilisation de CGMs confirment des précédentes publications et montrent que l'utilisation d'un petit déjeuner standardisé, qui est mieux toléré, peut être une bonne alternative au test de charge orale en glucose.

### **3.2 Etude de la réponse hémodynamique physiologique post prandiale chez des sujets sans facteurs de risque cardiovasculaire. Etude NUTRIVASC de type exposés / non exposés “nichée dans la cohort” SU.VI.MAX2**

**"The Impact of the French PNNS Guidelines on Vascular Function Following a Standardised Breakfast". (NUTRIVASC-NCT01579409)**

#### **3.2.1 Description de l'étude. Hypothèse de travail. Objectifs**

Nous émettons l'hypothèse qu'une alimentation inadéquate au long cours s'associe à des anomalies de la rigidité artérielle, de la microcirculation et de la fonction endothéliale qui sont amplifiées après un petit-déjeuner standardisé

##### **3.2.1.1 Objectif principal**

L'objectif principal est d'évaluer certains intégrateurs de risque cardiovasculaire chez des sujets en considérant leur index de qualité alimentaire.

##### **3.2.1.2 Objectif secondaire**

Déterminer le rôle joué par l'hyperglycémie aiguë sur ces intégrateurs de risque cardiovasculaire en recherchant une hétérogénéité en fonction de l'index de qualité alimentaire des sujets.

##### **3.2.1.3 Exposé du plan expérimental**

Nous avons exploré les paramètres suivants: fonction endothéliale, microcirculation et rigidité artérielle qui sont des intégrateurs de risque cardiovasculaire. L'étude a porté sur 94 sujets issus de la cohorte SU.VI.MAX2 (2 x 47 sujets), dans une étude exposés/non exposés selon un index d'adéquation aux recommandations alimentaires du Programme National Nutrition Santé (PNNS) et sélectionnés selon la qualité de leur alimentation à partir de deux bornes de score à définir *a priori* avec la composante alimentaire: une borne supérieure où seront classés les sujets qui ont une alimentation adéquate et une borne inférieure pour ceux qui ont une alimentation non adéquate conformément aux recommandations du PNNS.

Nous avons mesuré des marqueurs biologiques métaboliques, de stress oxydant, d'inflammation et de fonction endothéliale.

Sur une demi-journée, la vasomotricité endothélium-dépendante a été évaluée par laser-doppler au niveau de la microcirculation après administration d'acétylcholine par iontophorèse et l'amplitude de l'onde de pression avant/après hyperhémie post-occlusive (EndoPAT2000®) au niveau du membre supérieur. Nous avons mesuré également l'index d'augmentation (EndoPAT2000®) et la vitesse de l'onde de pouls (SphygmoCor®) des sujets.

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet immédiat d'un petit-déjeuner standardisé sur ces paramètres, notamment la microcirculation pour laquelle il n'existe pas de données, et en prenant en compte l'index de qualité alimentaire des sujets. L'intérêt principal de cette étude était de montrer le bénéfice de l'alimentation recommandée par le PNNS sur la rigidité artérielle, la fonction endothéliale et la microcirculation en tant que marqueurs intermédiaires du risque cardiovasculaire. Une des originalités de ce travail est l'exploration du rôle de la qualité de la consommation alimentaire au long cours sur les effets aigus d'un petit-déjeuner standardisé sur les paramètres vasculaires explorés.

#### **3.2.1.4 Populations étudiées**

Nous avons proposé cette étude aux sujets ayant participé à l'étude de cohorte SU.VI.MAX2 [505]. L'étude longitudinale randomisée en double aveugle contre placebo SU.VI.MAX a testé l'effet préventif d'une supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants sur l'incidence et la mortalité des pathologies cardio-vasculaires et des cancers. Cette étude réalisée de 1994 à 2003 a inclus 13017 sujets. Un total de 7200 sujets ont accepté de participer à l'étude prospective de cohorte appelée SU.VI.MAX2. Ces sujets, âgés de 45 à 70 ans, ont été évalués au cours de l'année 2007 pour leurs critères anthropométriques et métaboliques, avec une étude nutritionnelle permettant d'établir un score d'adéquation aux recommandations du PNNS, divisé en quartiles pour l'étude. Pour des raisons logistiques, de vue logistique, nous avons sélectionné les sujets habitant en Ile-de-France, qui n'ont aucune donnée manquante sur les principales variables biologiques, cliniques et alimentaires, avec une glycémie à jeun normale et en prévention primaire.



<b>Populations</b>	<b>Exposés à une alimentation inadéquate</b>	<b>Non exposés à une alimentation inadéquate</b>
<b>Nombre</b>	47	47
<b>Description</b>	Volontaires se situant dans le quartile inférieur du score d'adéquation au PNNS.	Volontaires se situant dans le quartile supérieur du score d'adéquation au PNNS.
<b>Durée de la participation</b>	Une demi-journée	Une demi-journée

### **3.2.1.5 Type d'essai**

Etude exposés / non exposés "nichée dans la cohorte" SU.VI.MAX2.

### **3.2.1.6 Retombées attendues**

Nous nous attendions à ce que les sujets ayant une moins bonne adéquation aux recommandations du PNNS aient des anomalies de la rigidité artérielle, de la fonction endothéliale et de la microcirculation plus importantes comparativement à ceux ayant une meilleure adéquation. Les résultats devraient renforcer l'intérêt cardiovasculaire des mesures préconisées dans le PNNS. Parallèlement le but de l'étude était de permettre d'évaluer ces intégrateurs de risque cardiovasculaire après un petit-déjeuner standardisé.

### **3.2.1.7 Sélection des personnes**

#### **3.2.1.7.1 Critères d'inclusion**

- Affiliation à la sécurité sociale.
- Ayant déjà participé à SU.VI.MAX 2. avec un score alimentaire connu en 2007.
- Score d'adéquation PNNS en 2011 dans le quartile inférieur ou supérieur déterminés par rapport à la distribution des scores PNNS en 2007.
- Age entre 50 et 75 ans.
- Habitant en Ile-de-France.

### **3.2.1.7.2 Critères de non-inclusion**

- Sauvegarde de justice, tutelle ou curatelle.
- Diabète connu avant inclusion (GAJ $\geq$ 1,26 g/l ou traitement antidiabétique).
- Prédiabète connu avant inclusion (GAJ $\geq$ 1,10 g/l).
- Antécédent d'événement cardiovasculaire (cardiaque, cérébral ou des membres inférieurs).
- Cancer connu.
- Tabagisme actif ou sevré dans les 3 années précédentes.
- HTA traitée.
- Dyslipidémie traitée.
- Port d'un stimulateur cardiaque.

### **3.2.1.8 Description du mode de recrutement**

L'étude a été proposée par courrier aux sujets répondant en 2007 aux critères de sélection et ayant un score d'adéquation au PNNS entre le 1<sup>er</sup> et le 40<sup>ème</sup> percentile et entre le 60<sup>ème</sup> et le 100<sup>ème</sup> percentile. L'envoi comportait une notice d'information détaillant toutes les explorations de l'étude, un questionnaire ayant pour objectif de vérifier l'éligibilité de chaque sujet et le courrier de demande de participation à l'étude. Une mise à jour des critères d'inclusion et de non-inclusion était effectuée à partir du questionnaire envoyé aux sujets lors de la pré-sélection.

Nous avons envoyé aux sujets répondant positivement à la proposition et rentrant dans les critères d'inclusion et de non-inclusion un nouveau questionnaire alimentaire. Le score PNNS 2011 pénalisé était calculé, permettant d'inclure ou non le sujet.

### **3.2.1.9 Critères de jugement**

#### **3.2.1.9.1 Critères primaires**

Comparaison des paramètres mesurés avant le petit-déjeuner standardisé entre les groupes exposés / non exposés.

Les paramètres suivants étaient considérés :

*Rigidité artérielle*

- Vitesse de l'onde de pouls carotidofemorale (VOP) mesurée par SphygmoCor®, fréquence cardiaque, durée du cycle cardiaque, durée de la diastole, Subendocardial viability ratio (SEVR)
- Index d'augmentation artérielle périphérique Aix mesuré par Endo-PAT2000® et SphygmoCor®
- Le débit cardiaque, le volume d'éjection, les résistances vasculaires systémiques mesuré par impédancemétrie cardiaque (Task Force monitor®)
- *Activité vagosympathique mesurée* par Task Force monitor®
- HF-FC et LF-FC en position couchée : pics de haute et de basse fréquences des variations de FC ; calcul du rapport LF/HF-FC
- LF-PAS en position couchée : pic de basse fréquence des variations de PA systolique

*Mesure du flux sanguin cutané par laser-doppler*

- Valeur moyenne et variations du flux sanguin cutané au niveau de l'avant bras pendant 6 minutes
- Valeur moyenne et variations du flux sanguin pendant 1 minute de respiration ample contrôlée à 6 cycles/ minute

*Evaluation de la fonction endothéliale*

- Mesure de l'amplitude de l'onde de pression digitale après hyperhémie avec l'Endo-PAT®,
- Fonction endothéliale microcirculatoire : mesure de la variation du flux sanguin après administration iontophorétique d'acétylcholine (laser-doppler)
- l'Endo-PAT® fourni aussi l'Aix sur l'artère digitale

*Mesure des pressions artérielles systolique, diastolique et pulsée*

- pression aortique et radiale par le SphygmoCor®)
- et digitale par le Task Force monitor®)

### **3.2.1.9.2 Critères secondaires**

Comparaison de l'évolution des mêmes paramètres mesurés après le petit-déjeuner standardisé en fonction du statut nutritionnel des sujets.

### **3.2.1.10 Durée de l'étude**

La période d'inclusion prévue était de 18 mois, la durée de participation pour chaque sujet était d'une demi-journée avec un rythme d'inclusion de 7 ou 8 sujets par mois. Nous avons prévu 4 mois supplémentaires pour le traitement des données, avec une durée totale de l'étude de 22 mois.

### **3.2.1.11 Présélection**

La présélection a été réalisée sur la base de données 2007 de SU.VI.MAX 2 selon le plan de recrutement suivant :

- questionnaire PNNS disponible
- habitants de l'Ile de France
- vérification des critères d'inclusion et de non inclusion ;

Le schéma ci-dessous montre le potentiel de recrutement à partir de ces critères.

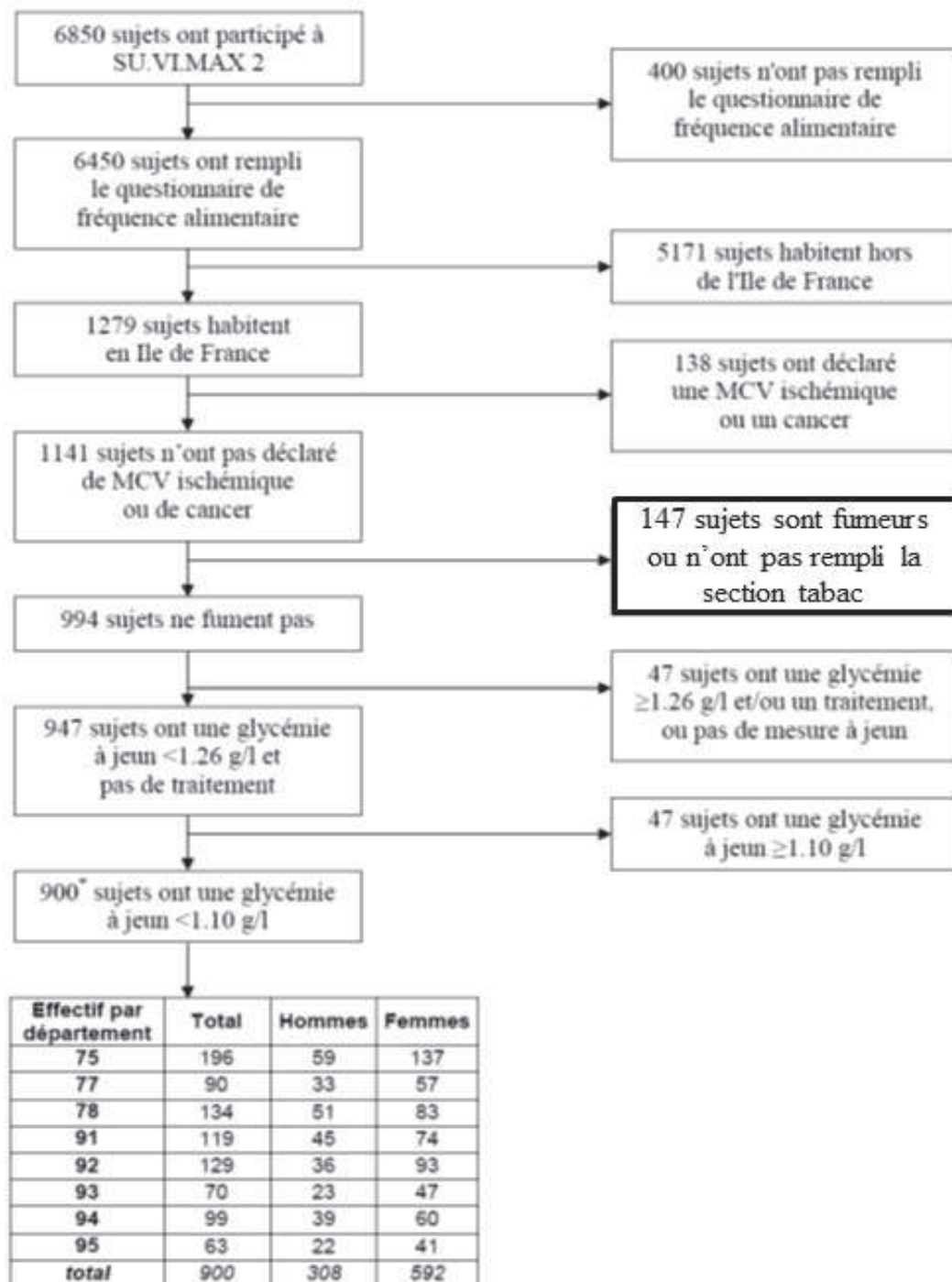
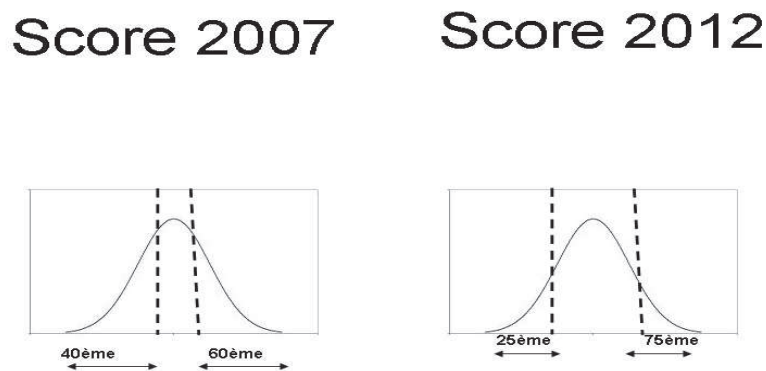


Figure 22: NUTRIVASC recrutement, potentiel et présélection

L'objectif était de sélectionner les exposés (mauvaise adéquation aux recommandations PNNS : quartile inférieur) et les non exposés (bonne adéquation : quartile supérieur) selon la distribution de la population en 2007. Il a été montré que la plupart des scores de qualité de l'alimentation sont positivement corrélés à l'apport énergétique [506]. En effet la probabilité d'atteindre les recommandations augmente avec l'apport énergétique. Afin de s'affranchir de ce potentiel biais, un système de pénalité a été développé. Les besoins énergétiques sont calculés à partir des équations de Schofield (en fonction de l'âge, du sexe, de la taille et du

poids du sujet) et d'un coefficient d'activité physique (pour les hommes x 1.78, pour les femmes x1.64). Si les apports énergétiques estimés sont supérieurs d'au moins 5% aux besoins le score est pénalisé [507]. Ce score pénalisé est un facteur prédictif important pour le changement du poids dans la cohorte SUVIMAX [508]. Dans notre sous-échantillon, environ 28% de la population SUVIMAX2 nécessitaient une correction de son score selon les données 2007.

L'étude a été proposée par courrier aux sujets répondant en 2007 aux critères de sélection et ayant un score d'adéquation au PNNS entre le 1er et le 40ème percentile et entre le 60ème et le 100ème percentile. L'envoi comportait une notice d'information détaillant toutes les explorations de l'étude, un questionnaire ayant pour objectif de vérifier l'éligibilité de chaque sujet et le courrier de demande de participation à l'étude. Une mise à jour des critères a été effectuée à partir du questionnaire envoyé aux sujets. Un nouveau score PNNS pénalisé a été réalisé, permettant d'inclure ou non le sujet.



Les participants devraient avoir les mêmes habitudes alimentaires entre 2007 et 2012

**Figure 23:** *NUTRIVASC schéma du score de la présélection*

### **3.2.1.12 Inclusion**

Les sujets acceptant de participer à l'étude renvoient un accord de participation, et le jour des explorations signent un consentement après l'examen médical préalable (poids, taille, pression artérielle, etc.)

### 3.2.1.13 Visite

Les explorations sont toutes réalisées dans le cadre d'une activité scientifique de recherche, et sont organisées sur une demi-journée.

Le jour de l'exploration, le traitement éventuel par inhibiteurs calciques, alpha- ou bêta-bloquants ne sera pas pris avant les explorations mais juste à la fin des explorations. Cette éventualité est très faible étant donné que les sujets ne présentent pas d'HTA traitée et n'ont pas présenté d'événements cardiovasculaires à l'inclusion. La prescription de bêta-bloquants pourrait être possible dans le cadre de palpitations. Les explorations, toutes non invasives, sont les suivantes et elles sont toutes utilisées dans la pratique clinique pour l'exploration des patients diabétiques dans le service d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition de l'hôpital Jean Verdier, Bondy.

Plusieurs explorations ont été réalisées à plusieurs reprises :

***-Mesure des variations de la PA et de la FC. Paramètres hemodynamiques - Task Force monitor®, CNSystems Medizintechnik, s/n 003040i-2010-411-005-GG-00000.***

L'exploration par le Task Force Monitor® permet l'enregistrement, en position couchée, en respiration à une fréquence contrôlée et pendant 6 minutes, des variations de la PA et de la FC.

L'analyse spectrale de ces variations permet de déterminer des index d'activité autonome cardiaque et d'activité sympathique vasculaire. Deux capteurs de pléthysmographie sont posés sur les 2 premiers doigts du volontaire et permettent les mesures. C'est un examen totalement indolore.

Mesure du débit cardiaque avec l'utilisation de l'impédance cardiaque (***Task Force monitor®***):

La méthode est basée sur les variations de la résistance électrique au niveau de la poitrine au cours des battements cardiaques.

***- Mesure de la PA -SphygmoCor®, Atcor Medical Pty Ltd, s/n 67-0363-2004 :***

Le volontaire est confortablement allongé. Un tonomètre d'aplanation permet la mesure simultanée de sa PA au niveau de la carotide (artère du cou) et de son artère radiale (au niveau du poignet).

Cet appareil est apposé sur la peau de manière totalement indolore. Aucun effet secondaire n'est attendu. L'exploration permet d'évaluer la rigidité des artères et la PA.

***- Mesures des fluctuations spontanées du flux sanguin par laser doppler-Periflux System 5000®, PERIMED, s/n 201052:***

Les fluctuations spontanées du flux sanguin au niveau de l'avant bras sont analysées par laser-doppler (système Périflux®) pendant 6 minutes au repos, puis au cours d'1 minute de

respiration profonde (6 fois/minute). La baisse attendue du flux sanguin cutané en inspiration profonde est liée à l'activité sympathique.

Une mesure est également réalisée après administration par iontophorèse d'acétylcholine (Miocholé<sup>®</sup> 20mg de chlorure d'acétylcholine/flacon, CHAUVIN<sup>®</sup>, application cutanée de 4 mg). La poudre de miocholé qui contient le chlorure d'acétylcholine est diluée avec 1 ml d'eau stérile et 200 µl de cette solution sont utilisées pour une application cutanée. L'iontophorèse (ou ionophorèse) est une technique qui utilise un très faible courant électrique pour une diffusion locale de l'acétylcholine à travers la peau. Ainsi, même en utilisant une dose 2,5 fois inférieure à la norme ce produit dilate les vaisseaux de façon strictement locale et provoque tout au plus une petite rougeur locale de la peau qui disparaît rapidement, sans danger de réaction générale. Cette exploration est indolore et prend au total environ 15 minutes.

**- Mesure de la réactivité endothéliale - Endopat2000<sup>®</sup>, Itamar Medical ltd, s/n 1352 :**

Cet examen permet d'évaluer la réactivité de l'endothélium (la couche de cellules bordant l'intérieur des artères) au niveau d'une des artères digitales. Pour cela, un petit manchon est placé au niveau de l'extrémité de ses index ou de ses majeurs et est gonflé de façon totalement indolore. Ensuite, nous plaçons un brassard au niveau de l'avant-bras dominant et nous le gonflons 5 cm de mercure au dessus de sa PA systolique pendant 5 minutes. Le patient peut ressentir un léger inconfort pendant que le brassard est gonflé. Quand nous relâchons le brassard, nous poursuivons les mesures au niveau des manchons placés aux extrémités des doigts. La durée totale d'examen n'excède pas 20 minutes. Les manchons restent en place pendant le reste de la matinée, nécessitant que le volontaire reste installé tranquillement pendant la durée des explorations.

**- Mesure de la composition corporelle BODYSTAT<sup>®</sup>QUADSCAN, s/n410151 :**

Il s'agit d'une méthode d'impédancemétrie totalement indolore et largement utilisée pour évaluer la composition corporelle : notamment la masse maigre et la masse grasse. Les mesures prennent une quinzaine de minutes. Deux électrodes sont posées sur la main droite et le pied droit et un courant électrique de très faible intensité et indolore est délivré pendant quelques secondes.

Ces explorations ont été réalisées à jeun en une heure environ.



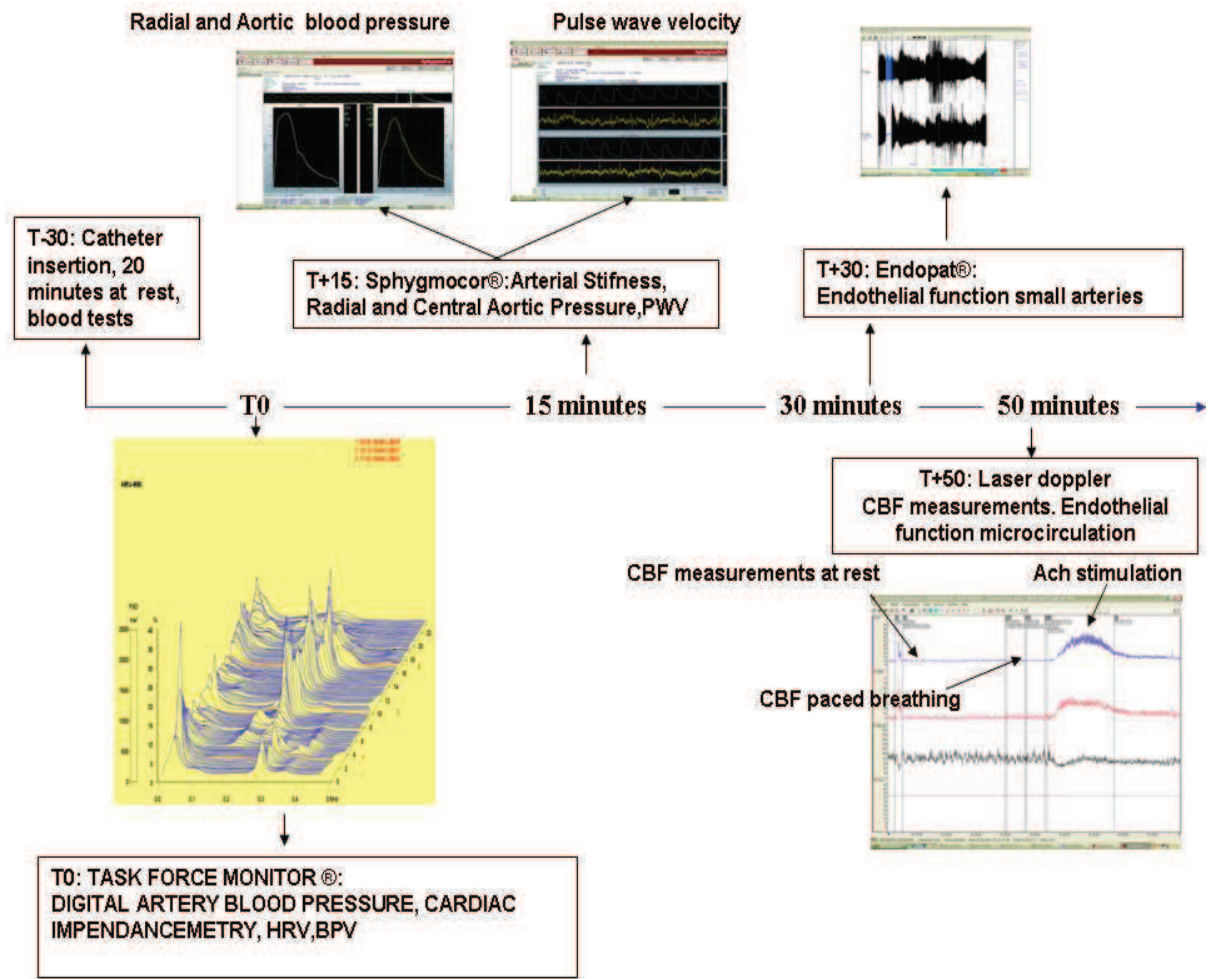


Figure 24: NUTRIVASC Série d'explorations sur une heure

Nous avons fait le même cycle des mesures 1h, 2h et 3h après petit déjeuner (Figure 25).

### 3.2.1.14 Prise d'un petit déjeuner standardisé

Un petit-déjeuner standardisé comprenant un café ou un thé non sucré (<200 ml), 200 ml de jus d'orange et 60g de pain avec 30g de confiture a été offert au patient qui devait le consommer en 15 minutes à la fin du premier cycle. Ce repas apportait environ 75 g de glucides

:

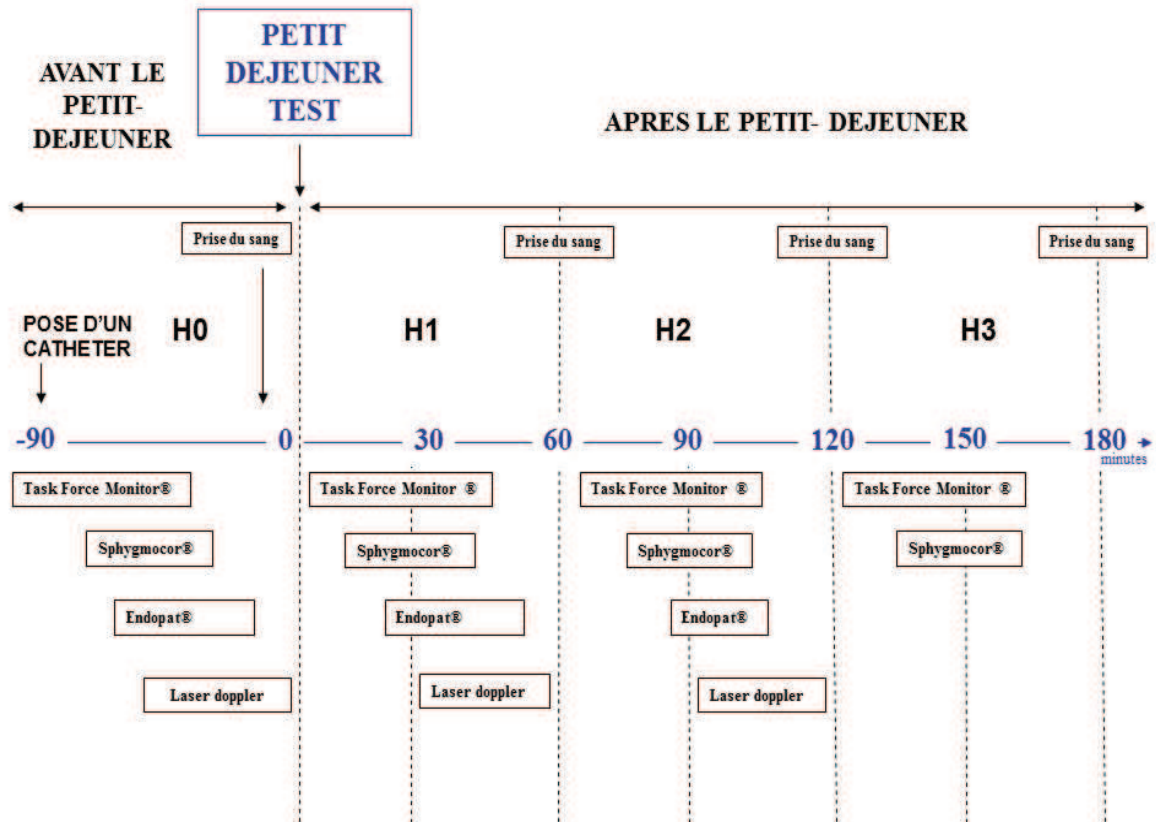


Figure 25: NUTRIVASC protocole d'explorations sur une demi-journée.

### 3.2.1.15 Explorations biologiques

Les explorations biologiques décrites dans le tableau ci-dessous étaient réalisées à jeun et après le petit-déjeuner standardisé.

	A jeun	60	120	180
		minutes après un petit-déjeuner standardisé		
<i>Métabolisme</i>				
HbA1c, fructosamine	X			
Glycémie, C peptide	X	X	X	X
Lipides dont les acides gras libres	X	X	X	X
Adipocytokines (leptine, adiponectine)	X			
<i>Stress oxydatif</i>				
Nitrotyrosine,	X		X	
LDL oxydées,	X		X	
<i>Marqueurs inflammatoires</i>				
IL6, CRPus	X		X	
<i>Marqueurs endothéliaux</i>				
VCAM, sélectine E	X		X	
Microalbuminurie	X			

Tableau 14: *NUTRIVASC Explorations biologiques.*

Une prise de sang (30 ml au total, 25ml sur des tubes BD vacutainer®, référence 369032, (tubes secs) et pour la plasmathèque 5 ml sur des tubes BD vacutainer®, référence 368856 (tubes EDTA) a été effectuée à chaque cycle d'explorations. Les tubes étaient centrifugés, le surnageant était récolté et aliquoté, en adéquation avec les procédures de notre plateforme technique.

### 3.2.1.16 Analyse statistique des données

#### 3.2.1.16.1 Calcul d'effectif

Le nombre de patients inclus a été fixé à 47 par groupe afin d'avoir une puissance de 80% pour détecter par le test t de Student au risque de première espèce bilatéral fixé à 5% une différence de VOP de 1 m/sec, en prenant en compte un écart-type de VOP de l'ordre de 1,7 m/sec. Pour les autres variables étudiées, cette taille d'échantillon devait permettre d'obtenir une puissance de 80% pour détecter une différence entre groupes correspondant à une taille d'effet ( $\Delta/\sigma$ ) de l'ordre de 0,6.

En ce qui concerne l'écart de la VOP, nous nous sommes basés sur les résultats d'une étude finlandaise concernant la consommation de fruits et légumes pendant l'enfance et

l'adolescence chez des sujets sains jeunes (tranche d'âge 40-45 ans). La VOP était moindre de 0.47 m/sec chez les consommateurs de fruits et de légumes [509]. Etant donné l'âge plus élevé de nos sujets (60-65 ans) et que nous considérons l'exposition à l'alimentation globalement, nous avons estimé dans notre étude que la différence de VOP dans les groupes exposés/non exposés serait de 1 m/sec.

La pertinence clinique de cet écart de VOP a été démontrée par Blacher et al.[510]: il existe une augmentation de 14% de la mortalité cardiovasculaire et totale pour une augmentation de 1m/sec.

### **3.2.1.16.2** *Description du plan d'analyses statistiques*

Tous les patients de la cohorte ont été analysés. Les modèles mixtes d'ANCOVA utilisés sont peu sensibles aux données manquantes.

Tous les paramètres quantitatifs ont été résumés de manière descriptive dans chaque groupe et pour chaque temps auquel ils sont recueillis. L'analyse statistique descriptive comprend pour chaque paramètre quantitatif à chaque temps : moyenne, déviation standard, minimum, maximum, médiane et quartiles, nombre de valeurs manquantes. Les paramètres qualitatifs ont été exprimés par la fréquence de distribution et les intervalles de confiance bilatérale à 95% associés.

Un seuil bilatéral à 5% pour les analyses globales des 2 groupes a été utilisé.

Aucun critère statistique d'arrêt n'est nécessaire.

### **3.2.1.16.3** *Analyse des critères principaux*

Relation entre les paramètres mesurés à jeun, avant le petit-déjeuner standardisé, des patients et leur statut nutritionnel.

La comparaison des données de base chez les sujets en fonction de leur statut a été effectuée par analyse de covariance (ANCOVA) à 1 facteur (i.e. statut alimentaire). L'âge sera considéré en covariable. En cas de non vérification des critères de validité des ANCOVA, une transformation normalisante a été effectuée ou en cas d'échec de cette dernière une ANCOVA non paramétrique a été effectuée.

#### **3.2.1.16.4** *Analyse des critères secondaires*

Elle consiste à comparer l'évolution des paramètres mesurés avant et après le petit-déjeuner standardisé en fonction du statut nutritionnel des sujets.

La comparaison de l'évolution des paramètres en pré- et post- petit-déjeuner standardisé a été effectuée selon un modèle mixte d'analyse de covariance (ANCOVA) à 2 facteurs (i.e. statut nutritionnel et temps), l'âge étant considéré comme covariable.

## **3.2.2 Résultats**

### **3.2.2.1 Caractéristiques de la population NUTRIVASC**

Le groupe du Q4 (quatrième quartile) du score PNNS c'est à dire le groupe avec les bonnes habitudes alimentaires était plus âgé, avait un BMI, tour de taille, tour de hanches et masse grasse supérieur par rapport au groupe Q1.

#### **3.2.2.2 Résultats à jeun (H0)**

##### **3.2.2.2.1 *Biologie.***

Il n'y avait pas de différence significative pour sur les paramètres d'activité physique et métaboliques à jeun entre les 2 groupes.

##### **3.2.2.2.2 *Pression et rigidité artérielles. Cycles cardiaque. Données fournis par le Sphygmocor®***

Dans le groupe avec les bonnes habitudes alimentaires la diastole représente 66,7% du cycle cardiaque vs 64,6% chez le groupe qui ne suit pas les recommandations alimentaires. La FC est significativement plus basse dans le Q4 que Q1.

##### **3.2.2.2.3 *Activité autonome cardiovasculaire. Paramètres hémodynamiques. Données fournis par le Task Force Monitor®***

##### **3.2.2.2.4 *Activité autonome cardiovasculaire et paramètres hémodynamiques***

L'activité autonome cardiovasculaire et les modifications hémodynamiques à jeun chez les sujets âgés en bonne santé ne présentaient pas de différence statistiquement significative quand on compare les deux groupes.

##### **3.2.2.2.5 *Fonction endothéliale. Données fournis par ENDOPAT® et PERIMED®***

La fonction endothéliale, le flux sanguin cutané au repos ou suite à l'administration par iontophorèse d'acetylcholine à jeun chez les sujets âgés en bonne santé ne présentait pas de différence statistiquement significative quand on compare les deux groupes.

De même le vasoconstriction induite par l'inspiration profonde ne diffère pas entre les 2 groupes.



**Title**

**Adherence to the French dietary guidelines is associated with lower resting heart rate, longer diastole duration and less myocardial oxygen consumption. The NUTRIVASC study**

**Author's block:**

Marios Fyrekidis<sup>1,2</sup>, Emmanuelle Kesse-Guyot<sup>2</sup>, Paul Valadier<sup>2</sup>, Nathalie Amarit<sup>2</sup>, Pilar Galan<sup>2</sup>, Serge Hercberg<sup>2</sup>, Emmanuel Cosson<sup>1,2</sup>

1) AP-HP, Department of Endocrinology, Diabetology and Nutrition, CRNII-IdF, CINTO, Paris Nord University, Hôpital Jean Verdier, Bondy, France.

2) Équipe de Recherche en Épidémiologie Nutritionnelle (EREN) Inserm U1153 /Inra 1125/Cnam/Université Paris 13, France.

**Corresponding Author: Professor Emmanuel COSSON**

Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, Jean Verdier Hospital, avenue du 14 Juillet, 93143 Bondy cedex, France

☎ (Int)+33 (0)148026380

☎ (Int)+33 (0)148026356

✉ emmanuel.cosson@aphp.fr

**Key words:** French dietary guidelines, nutrition, cardiovascular risk integrators, arterial stiffness, endothelial function

SBP: Systolic Blood Pressure, DBP: Diastolic Blood Pressure, MAP: Mean Arterial Pressure, PP: pulse pressure, SV: Stroke Volume, SVI: Stroke Volume Indexed, CO: Cardiac Output, CI: Cardiac Output Indexed, TPR: Total Peripheral Resistance, TPRI: Total Peripheral Resistance Indexed, IC: Index of Contractility, ACI: Acceleration Index, LVWI: Left Ventricular Work Index, LVEF: Left Ventricle Ejection Fraction, TFC: Thoracic Fluid Content, LF: Low Frequency band of the heart rate spectrum, LFHF: ratio of low to high frequency band of the heart rate spectrum, HF: High Frequency band of the heart rate spectrum in normalised units expressed as percent of the total spectrum.



## **Abstract**

### **Introduction**

The French National Nutrition and Health Program (PNNS), has been introduced for the prevention of cardiovascular diseases, but also cancer, osteoporosis and obesity. The objective of the NUTRIVASC study was to investigate the association of cardiovascular risk markers like endothelial function, arterial rigidity and cardiac autonomic activity with the adherence to PNNS guidelines.

### **Methods**

We conducted an exposed/unexposed study nested in the SU.VI.MAX 2 cohort. Participants had no cardiovascular risk factors. A validated PNNS score reflecting the adherence to PNNS guidelines was calculated from repeated 24-hour food records in 2007 and 2012. We screened 6850 participants, 900 fulfilled the inclusion criteria, 200 resided in the Paris area and 49 subjects accepted to participate in the study. Two groups were created: the exposed group that included participants who did not adhere to PNNS guidelines (Q1, n=23, group with the lower PNNS score quartile) and a second group of unexposed participants who adhered to guidelines (Q4). Physical activity was also assessed in 2007 with a validated questionnaire. We measured at fasting non-invasively peripheral and central blood pressures, arterial stiffness, cardiac cycle duration, myocardial perfusion indices, stroke volume and peripheral resistance using applanation tonometry and impedance cardiography. We also investigated the cutaneous blood flow, cardiac autonomic nervous system activity, endothelial function by measuring reactive hyperemia after brachial artery ischemia, and body composition by bioelectrical impedance analysis.

### **Results**

We included 37 women. The Q4 group was older ( $p=0.04$ ), had higher body mass index ( $p=0.04$ ) and fat mass ( $p=0.04$ ) than Q1 group. There were no differences between Q4 and Q1 for metabolic parameters and physical activity indexes. Blood pressure, endothelial function, and cardiac autonomic function were similar in both groups. Pulse wave velocity was lower than predicted for the same age category ( $p<0.001$ ) but did not differ between Q1 and Q4. After adjustment for sex, age and BMI, Q4 compared to Q1 group had a lower heart rate ( $p=0.042$ ), a longer diastole duration ( $p=0.049$ ), a trend for higher SEVR ( $p=0.067$ ), and lower heart rate-pressure product ( $p=0.009$ ).

#### **Conclusion**

Long term adherence to PNN5 guidelines had a favorable impact on lower heart rate, longer diastole duration and lower myocardial oxygen consumption.

**Clinical Trial Registration:** <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01579409>

## Introduction

Endothelial function, arterial stiffness and vago-sympathetic activity are considered as integrators of cardiovascular risk factors, since they reflect the duration and intensity of exposure to these factors. Endothelium plays a major role in the regulation of vascular tone and the development of atherosclerosis<sup>1,2</sup>. In addition to gender and age<sup>3</sup>, the components of the metabolic syndrome, such as diabetes<sup>4</sup>, hypertension, dyslipidemia and obesity, are associated with endothelial dysfunction<sup>1,2,5</sup> and represent current therapeutic targets. Arterial stiffness shares with endothelial function similar modifiable determinants: obesity<sup>6</sup>, glucose intolerance<sup>7</sup>, metabolic syndrome<sup>8</sup>, type 1 and 2 diabetes<sup>9</sup>, smoking<sup>10</sup> and high cholesterol<sup>11</sup>. Nutritional factors can acutely activate the autonomous nervous system during food intake with the afferent pathway of vagal nerve fibers *via* the release of neuro-endocrine hormones<sup>12,13</sup>. In return the activity of the sympathetic or parasympathetic nervous system in the periphery regulates the function of organs such as liver, white and brown fat, muscle, and pancreatic islets alpha and beta cells controlling metabolism and energy storage<sup>14</sup>, and may induce changes in cardiovascular parameters.

The beneficial effect of nutrition and physical activity can be observed in childhood and can decrease arterial stiffness very early by the age of 10 years<sup>15</sup>, while the introduction of healthy food habits early in life reduce arterial rigidity later during adult life<sup>16</sup>. Endothelial function is also influenced by diet<sup>17</sup>. A beneficial effect of a Mediterranean diet has been shown with a reduction of major cardiovascular events in primary prevention with olive oil or nuts<sup>18</sup>, or in secondary prevention<sup>19</sup>. Coffee drinking is a good example of the interaction of nutrition and cardiac autonomic modulation since caffeine is known to increase vagal autonomic nerve activity<sup>20</sup>, whereas high energy drinks with alcohol can provoke reduced parasympathetic tone<sup>21</sup>.

The protective effect of antioxidant vitamins on endothelial dysfunction<sup>22</sup> has suggested a role for oxidative stress. Currently there is a discrepancy between the positive results of short-term intervention studies with antioxidant treatment in arterial stiffness and oxidative stress markers<sup>23</sup> compared to longer term diet interventions. A study conducted on a sample of over 1000 subjects of SU.VI.MAX cohort did not show any beneficial effects on carotid atherosclerosis and arterial stiffness after a long-term supplementation with antioxidant vitamins and minerals<sup>24</sup>. However few studies compared cardiovascular parameters according to the diet pattern.

In this context, the French National Health and Nutrition Program (Programme National Nutrition Santé or PNNS) was launched in 2001 to decrease cardiovascular diseases, but also cancer, osteoporosis, obesity, through diet and lifestyle counselling.

The main objective of the NUTRI-VASC study was to investigate the protective mechanisms of long term adherence to the PNNS guidelines on cardiovascular risk markers in a very selected population without any confounding factors. We hypothesized that subjects that did not follow the recommendations of the PNNS in the long run would have higher arterial stiffness, endothelial dysfunction, and greater sympathetic activity.

## Methods

The NUTRI-VASC study was a registered prospective clinical trial (NCT01579409) nested in the SU.VI.MAX2 (Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants) cohort. To summarize, the longitudinal randomized double-blind study SU.VI.MAX which was conducted between 1994 and 2003 tested in 13,017 subjects the preventive effect of supplementation with antioxidant vitamins and minerals *versus* placebo on cardiovascular and cancer mortality. A total of 6850 subjects agreed to participate in a prospective cohort study called SU.VI.MAX2. These subjects, aged 45 to 70 years, were evaluated in 2007 for their anthropometric and metabolic criteria and fulfilled a nutritional questionnaire.

### Study design

#### Screening and selection

We first screened the subjects who had a 24-hour food record questionnaire fulfilled in 2007, who were 50 to 75 years old and who were living in Paris area. All participants had health insurance. Non inclusion criteria were: known cancer, history of cardiovascular disease (stroke, myocardial infarction, amputation); hypertension (defined as systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg, diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg or antihypertensive therapy); dyslipidemia (LDL  $> 4.9$  mmol/L or lipid lowering treatment); active smoking or smoking stopped during the last 3 years; known diabetes before inclusion (defined as fasting glycemia  $\geq 126$  mg/dL or antidiabetic therapy), fasting hyperglycemia (fasting glycemia  $\geq 110$  mg/dL), having a pacemaker.

#### Definition of exposed and unexposed subjects

Our objective was to compare the subjects who chronically adhered or did not adhere to the PNNS recommendations with the use of an index derived from the PNNS questionnaire. Briefly PNNS recommendations for the general population in order to meet the daily caloric needs for nutritional adequacy were: at least 5 fruits and vegetables per day, starchy foods at every meal, 3 dairy products (milk, yogurt, cheese), 1-2 servings of meat, eggs and fishery products per day, limit added fat, sugar and salt, drink water as much as you like and increase physical activity. A score of nutrient adequacy to PNNS recommendations was constructed and validated<sup>25</sup>. It has been shown that most of the times quality food scores are positively correlated with energy intake<sup>26</sup>. Therefore, the probability of achieving the recommendations increases with high-energy intake and eating large quantities. To avoid this potential bias, a penalty system was developed. Energy requirements were calculated from the Schofield equations (equations included the age, sex, size and body weight of the subject) adjusted with a coefficient of physical activity (x1.78 for men, for women x1.64). If the estimated energy intake reported from the questionnaire was at least 5 % higher compared to the theoretical one calculated by the Schofield equation, then the score was penalized as previously published<sup>25</sup>. The penalized score was an important predictor for weight change in the SU.VI.MAX cohort<sup>27</sup>.

Screening was performed in the 2007 database among subjects who participated in the SU.VI.MAX2 cohort study. In our sub-sample, about 28% of the population SU.VI.MAX2 had a penalized score.

First, we selected the subjects who had a penalized PNNS 2007 score between the 1<sup>st</sup> and the 40<sup>th</sup> percentile (lower adherence to PNNS recommendations) and between the 60<sup>th</sup> and 100<sup>th</sup> percentile (highest adherence to PNNS recommendations). In 2012, we screened these subjects by mail. Subjects received an information leaflet detailing the protocol, a questionnaire aimed to verify their eligibility and the participation request mail for the study.

A new penalized PNNS score was calculated and participants fulfilled the inclusion and non inclusion criteria. Selected subjects had the PNNS score in 2007 and 2012 the either in the first quartile (Q1: low adherence to PNNS recommendations) or in the fourth quartile of the PNNS score distribution (Q4: high adherence to the recommendations).

#### **Physical activity questionnaire**

Physical activity was also assessed with a validated questionnaire in 2007. The questionnaire included questions about physical activity during leisure, working hours or at home and their duration according to their intensity as weak, medium or high as well as a sedentarity score and duration <sup>28</sup>.

#### **Study protocol**

The tests were performed in the department of Endocrinology - Diabetology - Nutrition at Jean Verdier Hospital, Bondy for research purposes between September 2012 and December 2013. Participants arrived at 07:30 in the morning after an overnight fast and were instructed to abstain from drinking alcohol-containing drinks, coffee or tea during the morning prior to the study and to void their bladder. Measurements were conducted at an ambient temperature of 22 to 24°C, 20 min after the insertion of a catheter for drawing blood in the right arm, in a room where noise and light were kept to a minimum. Participants remained at rest in the supine position throughout the tests. All cardiovascular tests were non-invasive and lasted approximately 2 hours in the order shown in Figure 1.

#### **- Arterial rigidity and central blood pressure**

Measurements were performed by applanation tonometry on the radial artery (Sphygmocor®, Atcor Medical, Australia). We measured (i) radial and central systolic (SBP) and diastolic (DBP), blood pressures pulse pressures ( $PP = SBP - DBP$ ), PP augmentation ratio, (ii) two arterial stiffness indices: carotid-to-femoral pulse wave velocity (PWV) and non adjusted aortic Augmentation Index (AIx) or adjusted for a HR of 75 beats / minute (AIx@75), and (iii) cardiac cycle duration, systole and diastole duration based on the blood pressure curve. We assessed myocardial oxygen consumption by calculating the double product (HR x central SBP), and subendocardial viability ratio ( $SEVR = \text{diastolic time index} / \text{tension-time index}$ ).

#### - Cardiovascular autonomic nervous system activity

Finger artery BP and heart rate (HR) were recorded continuously in a supine position for 6 minutes at a paced breathing rate of 12 breaths / minute using photoplethysmographic sensors and synchronous 6-lead ECG recordings (Task force monitor®, CNSystems Medizintechnik, Austria). Cardiac autonomic nervous system activity was explored by spectral analysing HR and SBP variations<sup>29</sup>. The opposite brachial artery was used to calibrate the BP measurements in the digital artery. Cardiac autonomic activity was expressed as (i) normalized spectral HR variability (HRV); (ii) normalized spectral index (i.e. the percentage of the high frequency band (HF: 0.15-0.40 Hz) / total spectrum) of HR variations (HF-HR: vagal function); (iii) the ratio of low frequency (LF: 0.03-0.15 Hz) to the HF bands of HR variations (LF/HF-HR: sympathetic-parasympathetic balance) and (iv) LF band of the SBP spectrum (LF-SBP: 0.075-0.15 Hz, vascular sympathetic activity).

#### - Hemodynamic parameters



Impedance cardiography (Task force monitor®, CNSystems Medizintechnik, Austria) was used for the measurement of hemodynamic parameters: stroke volume, cardiac output, total peripheral resistance, ventricular ejection time, left ventricular work index and thoracic fluid content.

#### **- Arterial endothelial function**

Arterial endothelial function was assessed at the level of one of the digital arteries by recording finger arterial pulsatile volume changes with the Endopat2000® system (Itamar Medical, Israel) which comprises plethysmographic bio-sensors. Reactive hyperemia was measured after occluding blood flow on the brachial artery for 5 minutes on one arm. Reactive hyperemia index is the post-to-pre occlusion signal ratio in the occluded side, normalized to the control side.

#### **- Measurement of cutaneous blood flow**

Cutaneous blood flow was measured in the forearm using laser Doppler flowmetry (Periflux System 5000® PERIMED, Sweden) for 6 minutes at rest and during 1 minute of paced breathing (6 breaths / minute).

CBF fluctuations during 1 minute of paced breathing (6 breaths / minute) account for microvascular autonomic activity. Cutaneous blood flow decreases when inhaling due to sympathetic nervous system activation. The percent of decrease from the zenith to the nadir of the signal wavelet was calculated, and the mean decrease during the three last breaths was used as an index of microvascular sympathetic activity<sup>30</sup>.

CBF changes after transcutaneous administration of acetylcholine (Ach: Miochole® 20mg of Ach chloride / vial, CHAUVIN®, topical application of 4 mg) with iontophoresis were also measured to explore endothelial function. Powder miochole containing Ach chloride was

diluted in 1 ml sterile water and 200 µl of this solution was used for a skin application. After Ach administration we measured: (i) maximal cutaneous blood flow (maximal CBF), (ii) cutaneous blood flow incremental area under the curve (AUC) during 3 min from the beginning of Ach administration, which is considered an integrator of microvascular endothelial function <sup>31</sup>; (iii) delay from the beginning of Ach administration to the maximal cutaneous blood flow (peak delay), (iv) peak tangent from basal to maximal cutaneous blood flow (tangent increase represents the acceleration in tissue perfusion), and (v) vasodilation duration, from the beginning of Ach administration to the return to a level 20% higher than basal cutaneous blood flow.

#### - Body composition analysis

Body composition (lean mass and fat body mass) was determined by bioelectrical impedance (Bodystat®Quadscan, EuroMedix, Germany).

#### Biochemistry

Blood samples were collected at fasting when the subject arrived. Glucose level was measured in the venous plasma by colorimetry with the glucose oxidase method (Kone Optima, Thermolab System, France). HbA1c measurement was based on the turbidimetric inhibition immunoassay principle (Dimension® technology, Siemens Healthcare Diagnosis Inc., Newark, NJ, USA). The HbA1c level was standardized according to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Fructosamine was measured by the nitroblue tetrazolium colorimetric procedure (COBAS; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany).

Total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides were measured with enzymatic colorimetry (Hitachi 912, Roche Diagnostic, France). Low density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated using the Friedwald formula; no participants had

triglyceride concentrations greater than 400 mg/dl. The urinary albumin excretion rate was measured with laser immunonephelometry in a urine specimen (BN100; Dade-Behring).

### Sample size

The number of participants was set at 47 per group in order to obtain 80% power to detect by a Student t test with a difference of PWV of 1 m/sec, for  $\alpha$  at 5% and a standard deviation of 1.7 m/sec. For the other variables studied, the sample size will yield a 80% power to detect a difference between groups for an effect size ( $\Delta / \sigma$ ) of about 0.6. Regarding the difference in PWV, we have used the results of a Finnish study on the consumption of fruits and vegetables during childhood and adolescence in young healthy subjects (age range 40- 45 years). PWV was less than 0.47 m/sec in the group of consumers of fruits and vegetables <sup>16</sup>. Given the higher age of our subjects (60-65 years) and the increase in PWV with age, the fit with a full quadratic equation ( $a + b \times \text{age} + c \times \text{age}^2$ ) would provide better values of  $R^2$  than a linear fit <sup>22</sup>. We have considered that the non compliance to PNNNS guidelines would lead to a difference in PWV between the two groups of 1 m/sec. The clinical relevance of this difference in PWV was demonstrated by Blacher et al <sup>23</sup> and consistent with a 14% increase in cardiovascular and total mortality for an increase of 1 m/sec.

### Statistical analyses

All participants in the cohort were analyzed, all quantitative parameters were summarized in each group and each time they were collected. The descriptive statistical analyses included for each quantitative parameter at each time mean and standard deviation. Qualitative parameters were expressed by the frequency distribution. A bilateral threshold of 5% for the overall analyzes of the 2 groups was considered for statistical significance.

The relationship between parameters were measured at fasting was tested according to their nutritional status. The comparison of quantitative parameters in subjects according to their

status was done by analysis of covariance (ANCOVA) according to their nutritional status alone or by nutritional status and gender. Age, body mass index (BMI) and waist circumference were considered as covariates.

## Results

### Flow chart of the study and characteristics of the patients

Figure 2 shows the flow chart of the study. We finally included 49 subjects, 37 women and 12 men. Their characteristics and the comparison of the subjects who adhered (Q4: n = 26) or did not adhere (Q1: n = 23) to PNNS recommendations are shown in table 1. Compared to the Q1 group, the Q4 group was older, had higher BMI, higher waist and hip circumferences, and more fat mass with similar lean body mass. Other characteristics were similar, including physical activity evaluated in 2007. Participants did not gain or lose weight between 2007 and 2013 in a statistically significant way (mean weight change  $0.09 \pm 3.2$  kg,  $p = 0.838$ ).

At fasting, subjects in Q1 and Q4 groups had similar and normal blood levels of glucose, lipid parameters and urinary albumin excretion rate (Table 1).

### -Central and peripheral blood pressures, arterial rigidity and cardiac cycle parameters

Table 2 shows the comparisons of parameters obtained by applanation tonometry between the two groups. The comparisons were made before and after adjustment for the parameters which differed between groups at inclusion, with a first model including age and BMI (model 1), a second one including age and waist circumference (model 2) and a third one with gender, age and BMI (model 3). After adjustment (model 3), subjects in Q1 group as compared to subjects in Q4 group had higher HR and double product, similar PWV and Aix, with a higher tension time index, a lesser percent of diastole duration and a trend to higher SEVR.

We also analyzed the age-predicted value for PWV in all participants. The predicted values derived from the age quadratic equation ( $0.000 \times \text{age} + 0.83 \times 10^{-3} \times \text{age}^2 + 5.55$ )<sup>32</sup> which fitted the data better than the linear model (Figure 3). The measured values were significantly lower than the predicted values ( $p < 0.001$ ), the mean predicted values being  $9.3 \pm 0.6$  m/sec for Q4 and  $8.9 \pm 0.6$  m/sec for Q1<sup>32</sup> (Q1 vs Q4,  $p=0.306$ ).

After adjustment for HR, the cardiac cycle duration ( $p = 0.352$ ), the diastole duration ( $p = 0.370$ ) or the percent of diastole in the cardiac cycle ( $p = 0.966$ ), and SEVR ( $p = 0.945$ ) were similar in the two groups.

#### **Cardiovascular autonomic nervous system activity and hemodynamic parameters**

There was no significant difference for any of the cardiovascular autonomic activity indexes and the parameters provided by cardiac impedancemetry in Q1 and Q2 groups (Table 3).

#### **Endothelial function**

A higher HR was confirmed in the Q1 group compared to the Q4 group. Endothelial function in small arteries (reactive hyperemia index) and in cutaneous microcirculation (CBF after Ach administration) were similar in both groups. Cutaneous blood flow at rest was also similar in both groups (Table 4).

The CBF variations during paced breathing (6/minute) which account for sympathetic microvascular activity were also similar in the 2 groups.

## Discussion

The NUTRIVASC study is the first prospective study that examined the cardiovascular effects of the French nutritional guidelines. The main results of our study have shown that subjects that adhered to the guidelines with no cardiovascular risk factor, with similar physical activity and metabolic profiles, had lower heart rate, longer diastole duration with better myocardial perfusion with, lower heart rate blood pressure product than those who did not adhere. The subjects who adhered to PNNS guidelines did not have any significant differences in blood pressure, arterial rigidity, endothelial function, vago-sympathetic cardiac activity. These results were in favor of the Q4 group despite being older with unfavorable anthropometric characteristics including higher BMI, higher waist circumference and higher fat mass. This suggests that besides the effect on myocardial perfusion the nutritional adequacy to PNNS guidelines could slow the deterioration of cardiovascular risk integrators. Arterial rigidity indices like the carotid to femoral pulse wave velocity and the augmentation index in the digital artery, radial artery and in the aorta were not affected. Results for augmentation index were similar despite differences in age even after adjustment for a heart rate of 75 beats/ minute. A diet favouring meat, alcohol and poor in micronutrients was associated with increased arterial stiffness<sup>34</sup>, on the contrary a meal that is rich in  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids can acutely reduce arterial stiffness in healthy subjects<sup>35</sup>. The quality of nutrients especially low-glycemic-index diets have been shown to lower insulin secretion in healthy subjects, the preventive properties of this type of diet in large cohort studies have shown to decrease the risk of developing diabetes and cardiovascular diseases<sup>36</sup>. The mean measured PWV values compared to a reference group of subjects from the general population for the same age category with optimal or normal BP and no additional CV risk

factors were less than the 10th percentile of the reference values (7.9 m/sec) for both groups

32

Although the study was designed based on the assumption that adherence to PNNS guidelines could lead to a difference of 1 m / sec in PWV between the two groups, the actual difference was only 0.36 m/sec. The measured PWV values compared to the predicted ones were lower for both groups (mean PWV difference of 1.8 m/sec) indicating that both groups besides the absence of cardiovascular risk factors probably had a similar healthy way of living, a factor that probably attenuated the differences in arterial stiffness.

One of the major findings of our study was that participants that adhered to PNNS guidelines had a lower heart rate independently from their age with a similar vagosympathetic cardiac and sympathetic vascular activity. These results confirmed previous studies that examined the influence of adherence to Mediterranean type diet <sup>37</sup> and reported a lower heart rate which however was not confirmed in a prospective 5 year dietetic intervention <sup>38</sup>. A low heart rate with resting heart rates between 50-70 beats *per* minute has been shown to be associated with lower rates of mortality in the general population <sup>39</sup> whereas when the same heart rate was obtained with beta blocker mortality doubled <sup>40</sup> suggesting that a naturally occurring slow resting heart rate was a sign of good overall health.

Higher resting heart rate has been shown to be associated independently with arterial stiffness <sup>41</sup>. Heart rate reduction could also slow the accelerated age-related endothelial dysfunction through two potential mechanisms: the reduction in mechanical stress and the prolongation of the period of steady laminar flow <sup>42</sup>. In our study subjects that adhered to nutritional guidelines the longer diastole was associated with an improved myocardial perfusion. This positive result was heart rate dependent since the differences between the 2 groups were no longer significant after adjustment for heart rate.

Another important finding was that the double product of the heart rate with the aortic systolic blood pressure, an index of myocardial oxygen consumption <sup>43</sup>, was also lower in the Q4 group. The presence of similar stroke volume, preload, afterload and contractility with a lower heart rate suggest a more efficient myocardial metabolism for achieving similar cardiac workload. The nutritional factors which could account for the lower heart rate remain to be determined. A study in cultured myocardial cells suggested that the presence of n-3 fatty acids like docosahexaenoic acid had a positive influence in the  $\beta$ -adrenergic transduction <sup>44</sup>. The intrinsic diet effect on myocardium has been described in murine models and was independent from the diet effect on circulating hormone or substrate levels <sup>45</sup>. A difference in physical activity was not detected between the subjects who adhered or did not adhere to PNNS recommendations.

The hemodynamic profile of the two groups was also similar regarding the stroke volume, peripheral resistance, myocardial contractility, left ventricular ejection time and the venous return. Previous studies have shown that the consumption of high levels of saturated fat over the course of several weeks may lead to an increase of total peripheral resistance following the consumption of the high-fat meal relative to the low-fat meal <sup>46,47</sup>.

Blood pressure was measured on radial arteries and central blood pressure was derived from the generalized transfer function. Diastolic blood pressure is known to decrease in the sixth decade whereas SBP increases with age, usually leading to increased pulse pressure and a decrease of the pulse pressure amplification with aging is due to large artery stiffening <sup>48</sup>. The absence of statistically significant differences between the two groups in small arteries and in aorta regarding systolic, diastolic, mean, pulse pressures, pulse pressure augmentation ratio in the presence of similar vascular sympathetic activity despite the increasing age, might indicate a nutritional protective effect on the vessels.



The non-significantly different results in endothelial function indexes measured either at the level of the digital artery or in cutaneous blood flow at rest and after acetylcholine iontophoresis are also worth considering. The role of nutrients in endothelial function has been thoroughly studied: intraarterial glucose infusion impairs endothelium-dependent vasodilation in healthy humans in vivo<sup>49</sup>, transient hypertriglyceridemia decreases brachial artery reactivity, presumably through both endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms<sup>50</sup> while intravenous infusion of L-arginine improved endothelial function<sup>51</sup>.

The absence of differences in the hemodynamic profile and endothelial function in the present study is probably due to the fact that the group that did not follow the PNNS recommendations had good nutritional habits at least for caloric intake since their BMI was significantly lower with practically no weight change in a 5 year period

These results could not be related to antioxidant supplementation since patients did not receive any antioxidants since 2007 and recent meta analyses have confirmed that in subjects with no nutritional deficits the optimal source of antioxidants seems to come from diet and not from antioxidant supplements<sup>52</sup>.

One of the limitations of this study was that the difference in PWV was lower than expected leading also to a loss of statistical power. Another limitation was that the number of participants was smaller than initially planned in the study design and we could not exclude a type 2 statistical error by missing other important differences in cardiovascular integrators between the 2 groups. Finally a new evaluation of physical activity would have been useful in 2012. However a marked change in physical activity was unlikely since there was practically no weight change over a 5 year period.

The strengths of this study were that participants were included for the stability of their nutritional adequacy during two time points over a 5-year period. Both groups had no

cardiovascular confounders since they were free of cardiovascular risk factors. When we took in consideration the anthropometric measurements and their metabolic profile both groups probably shared a healthy way of living before the study thus increasing the accuracy of the selection based in the PNNS adequacy index.

The NUTRIVASC study affirmed that adherence to the French nutritional guidelines has a positive impact in resting heart rate and myocardial perfusion indices despite advancing age, higher fat mass and higher BMI. Beneficial effects of the guidelines also included the delay of vascular aging and less myocardial oxygen consumption. These results should strengthen the prevention program for cardiovascular diseases as recommended in the PNNS.

## References

1. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108:2054-2059.
2. Lerman A, Zeiger AM. Endothelial function: Cardiac events. *Circulation*. 2005;111:363-368.
3. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-476.
4. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ach-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes*. 1993;42:1017-1025.
5. Czernichow S, Greenfield JR, Galan P, Jellouli F, Safar ME, Blacher J, Hercberg S, Levy BI. Macrovascular and microvascular dysfunction in the metabolic syndrome. *Hypertens Res*. 2010;33:293-297.
6. Ferreira I, Henry RM, Twisk JW, van Mechelen W, Kemper HC, Stehouwer CD. The metabolic syndrome, cardiopulmonary fitness, and subcutaneous trunk fat as independent determinants of arterial stiffness: The amsterdam growth and health longitudinal study. *Arch Intern Med*. 2005;165:875-887.
7. Schram MT, Henry RM, van Dijk RA, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Westendorp N, Stehouwer CD. Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: The hoorn study. *Hypertension*. 2004;43:176-181.
8. Czernichow S, Greenfield JR, Galan P, Jellouli F, Safar ME, Blacher J, Hercberg S, Levy BI. Macrovascular and microvascular dysfunction in the metabolic syndrome. *Hypertens Res*. 2010.
9. Schram MT, Schalkwijk CG, Bootsma AH, Fuller JH, Chanurvedi N, Stehouwer CD. Advanced glycation end products are associated with pulse pressure in type 1 diabetes: The eurodiab prospective complications study. *Hypertension*. 2005;46:232-237.
10. Kool MJ, Hoeks AP, Struijker Boudier HA, Reneman RS, Van Bortel LM. Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:1881-1886.
11. Wilkinson IB, Prasad K, Hall IR, Thomas A, MacCallum H, Webb DJ, Frenneaux MP, Cockcroft JR. Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2007;39:1005-1011.
12. Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: Current prospects. *Nutrition*. 2000;16:866-873.
13. Williams EK, Chang RB, Storchlic DE, Umans BD, Lowell BB, Liberles SD. Sensory neurons that detect stretch and nutrients in the digestive system. *Cell*. 2016;166:209-221. doi: 210.1016/j.cell.2016.1005.1011. Epub 2016 May 1026.
14. Thorens B. Sensing of glucose in the brain. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;277-294. doi: 210.1007/978-1003-1642-24/16-24/13\_24/12.
15. Schack-Nielsen L, Molgaard C, Larsen D, Martyn C, Michaelsen KF. Arterial stiffness in 10-year-old children: Current and early determinants. *Br J Nutr*. 2005;94:1004-1011.
16. Aatola H, Koivistoinen T, Huuri-Kahonen N, Juonala M, Mikkilä V, Lehtimäki T, Vükari JS, Raitakari OT, Kahonen M. Lifetime fruit and vegetable consumption and arterial pulse wave velocity in adulthood: The cardiovascular risk in young finns study. *Circulation*. 2010;122:2521-2528.
17. Davis N, Katz S, Wylie-Rosett J. The effect of diet on endothelial function. *Cardiol Rev*. 2007;15:62-66.
18. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, Gomez-Gracia E, Ruiz-Gutierrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventos RM, Serra-Majem L, Pinto X, Basora J, Muñoz MA, Sorli JV, Martínez JA, Martínez-González MA. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368:1279-1290. doi: 1210.1056/NEJMoa1200303. Epub 1202013 Feb 1200325.
19. Serra-Majem L, Roman B, Estruch R. Scientific evidence of interventions using the mediterranean diet: A systematic review. *Nutr Rev*. 2006;64:S27-47.
20. Hibino G, Moritani T, Kawada T, Fushiki T. Caffeine enhances modulation of parasympathetic nerve activity in humans: Quantification using power spectral analysis. *J Nutr*. 1997;127:1422-1427.
21. Wiklund U, Karlsson M, Ostrom M, Messner T. Influence of energy drinks and alcohol on post-exercise heart rate recovery and heart rate variability. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2009;29:74-80.
22. Title LM, Cummings PM, Giddens K, Nassar BA. Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: An effect prevented by vitamins c and e. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:2185-2191.
23. Plaatinga Y, Ghiadoni L, Magagna A, Giannarelli C, Franzoni F, Taddei S, Salvetti A. Supplementation with vitamins c and e improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2007;20:392-397.

24. Zureik M, Galan P, Bertrais S, Mennen L, Czernichow S, Blacher J, Ducimetiere P, Hercberg S. Effects of long-term daily low-dose supplementation with antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1485-1491
25. Estaquio C, Kesse-Guyot E, Deschamps V, Bertrais S, Dauchet L, Galan P, Hercberg S, Castetbon K. Adherence to the french programme national nutrition sante guideline score is associated with better nutrient intake and nutritional status. *J Am Diet Assoc.* 2009;109:1031-1041
26. Wajers PMCM, Feskens EJM, Ocké MC. A critical review of predefined diet quality scores. *BJN.* 2007;97:219
27. Kesse-Guyot E, Castetbon K, Estaquio C, Czernichow S, Galan P, Hercberg S. Association between the french nutritional guideline-based score and 6-year anthropometric changes in a french middle-aged adult cohort. *Am J Epidemiol.* 2009;170:757-765
28. Charreire H, Kesse-Guyot E, Bertrais S, Simon C, Chaix B, Weber C, Touvier M, Galan P, Hercberg S, Oppert JM. Associations between dietary patterns, physical activity (leisure-time and occupational) and television viewing in middle-aged french adults. *Br J Nutr.* 2011;105:902-910. doi: 910.1017/S000711451000440X. Epub 000711451002011 Jan 000711451000421.
29. Bernardi L, Spallone V, Stevens M, Hilsted J, Frontoni S, Pop-Busui R, Ziegler D, Kempler P, Freeman R, Low P, Tesfaye S, Valensi P. Methods of investigation for cardiac autonomic dysfunction in human research studies. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;27:654-664
30. Valensi P, Smagghue O, Paries J, Velayoudon P, Nguyen TN, Attali JR. Peripheral vasoconstrictor responses to sympathetic activation in diabetic patients: Relationship with rheological disorders. *Metabolism.* 1997;46:235-241
31. Andreassen AK, Gullestad L, Holm T, Simonsen S, Kvernebo K. Endothelium-dependent vasodilation of the skin microcirculation in heart transplant recipients. *Clinical transplantation.* 1998;12:324-332
32. Boutouyrie P, Vermeersch SJ. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: Establishing normal and reference values. *Eur Heart J.* 2010;31:2338-2350
33. Blacher J, Safar ME, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Aortic pulse wave velocity index and mortality in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2003;63:1852-1860
34. Kesse-Guyot E, Vergnaud A-C, Fezeu L, Zureik M, Blacher J, Péneau S, Hercberg S, Galan P, Czernichow S. Associations between dietary patterns and arterial stiffness, carotid artery intima-media thickness and atherosclerosis. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation.* 2010;17:718-724
35. Chong MF, Lockyer S, Saunders CJ, Lovegrove JA. Long chain n-3 pufa-rich meal reduced postprandial measures of arterial stiffness. *Clin Nutr.* 2010;29:678-681
36. Jenkins DJ, Kendall CW, Augustin LS, Franceschi S, Hamidi M, Marchie A, Jenkins AL, Axelsen M. Glycemic index: Overview of implications in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:266S-273S.
37. Garcia-Lopez M, Martinez-Gonzalez MA, Basterra-Gortari FJ, Barrio-Lopez MT, Gea A, Beunza JJ. Adherence to the mediterranean dietary pattern and heart rate in the sun project. *European journal of preventive cardiology.* 2014;21:521-527
38. Garcia-Lopez M, Toledo E, Beunza JJ, Aros F, Estruch R, Salas-Salvado J, Corella D, Ros E, Covas MI, Gomez-Gracia E, Fiol M, Lamuela-Raventos RM, Lapetra J, Buil-Cosiales P, Carlos S, Serra-Majem L, Pinto X, Ruiz-Gutierrez V, Martinez-Gonzalez MA. Mediterranean diet and heart rate: The predimed randomised trial. *Int J Cardiol.* 2014;171:299-301
39. Kannel WB, Kannel C, Paffenbarger RS, Jr., Cupples LA. Heart rate and cardiovascular mortality: The framingham study. *Am Heart J.* 1987;113:1489-1494
40. Bangalore S, Messerli FH, Ou FS, Tamis-Holland J, Palazzo A, Roe MT, Hong MK, Peterson ED. The association of admission heart rate and in-hospital cardiovascular events in patients with non-segment elevation acute coronary syndromes: Results from 135 164 patients in the crusade quality improvement initiative. *Eur Heart J.* 2010;31:552-560
41. Park BJ, Lee HR, Shim JY, Lee JH, Jung DH, Lee YJ. Association between resting heart rate and arterial stiffness in korean adults. *Arch Cardiovasc Dis.* 2010;103:246-252. doi: 210.1016/j.acvd.2010.1003.1004. Epub 2010 May 1020.
42. Thorin E, Thorin-Trescases N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc Res.* 2009;84:24-32
43. Nelson RR, Gobel FL, Jorgensen CR, Wang K, Wang Y, Taylor HL. Hemodynamic predictors of myocardial oxygen consumption during static and dynamic exercise. *Circulation.* 1974;50:1179-1189
44. Grynberg A, Fournier A, Sergiel JP, Athias P. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the phospholipids of rat heart muscle cells on adrenoceptor responsiveness and mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2507-2520.

45. Liu J, Wang P, Douglas SL, Tate JM, Saam S, Lloyd SG. Impact of high-fat, low-carbohydrate diet on myocardial substrate oxidation, insulin sensitivity, and cardiac function after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311:H1-H10
46. Jakulj F, Zetzsche K, Bacon SL, van Wieringen LE, Key BL, West SG, Campbell TS. A high-fat meal increases cardiovascular reactivity to psychological stress in healthy young adults. *J Nutr*. 2007;137:935-939
47. Rontoyanni VG, Hall WI, Pombo-Rodrigues S, Appleton A, Chung R, Sanders TA. A comparison of the changes in cardiac output and systemic vascular resistance during exercise following high fat meals containing *omega*3 or *omega*6. *Br J Nutr*. 2012;108:492-499
48. Franklin SS, Gustin Wt, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The framingham heart study. *Circulation*. 1997;96:308-315
49. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Tang HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998;97:1695-1701
50. Lundman P, Eriksson M, Schenck-Gustafsson K, Karpe F, Torvall P. Transient triglyceridemia decreases vascular reactivity in young, healthy men without risk factors for coronary heart disease. *Circulation*. 1997;96:3266-3268
51. Piatti P, Fragasso G, Monti LD, Setola E, Lucotti P, Ferrero I, Paroni R, Galluccio E, Pozza G, Chierchia S, Margonato A. Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: Correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation*. 2003;107:479-486
52. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C. Antioxidant supplements and mortality. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2014;17:40-44

## Legends

**Figure 1:** Study protocol. HRV and BPV: heart rate variability and blood pressure variability.

CBF: cutaneous blood flow, Ach: acetylcholine, PWV: pulse wave velocity.

**Figure 2:** NUTRIVASC study screening

**Figure 3:** A) PWV: comparison of measured values with values predicted by age B) PWV distribution by age

**Table 1:** Participants characteristics

**Table 2:** Peripheral and central blood pressures measured by applanation tonometry, indices of arterial stiffness and cardiac cycle duration.

**Table 3:** Cardiac autonomic nervous system activity and cardiac impedancemetry measurements

**Table 4:** Endothelial function in small arteries and laser Doppler results

**Figure 1**

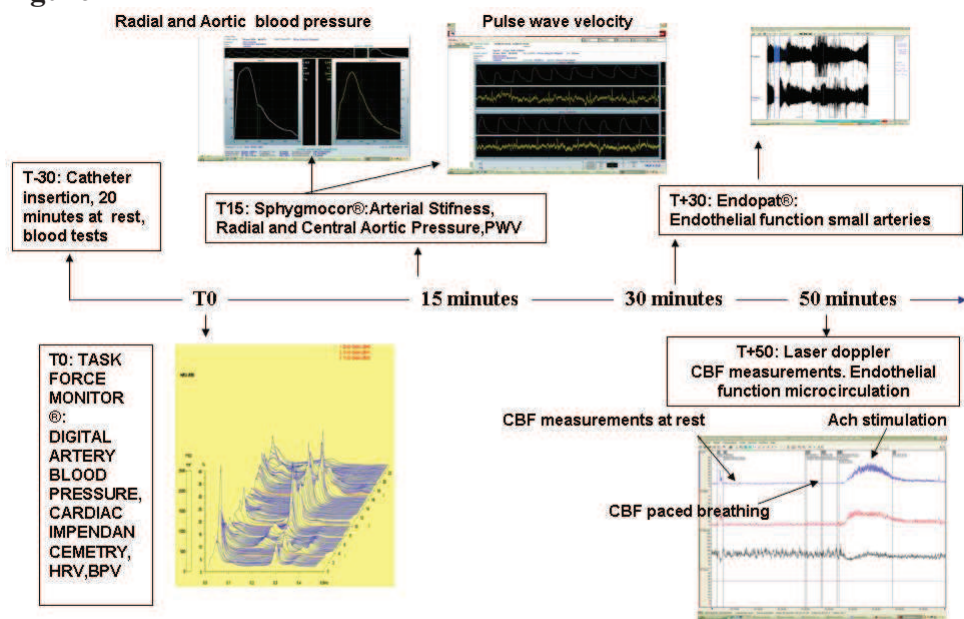


Figure 2

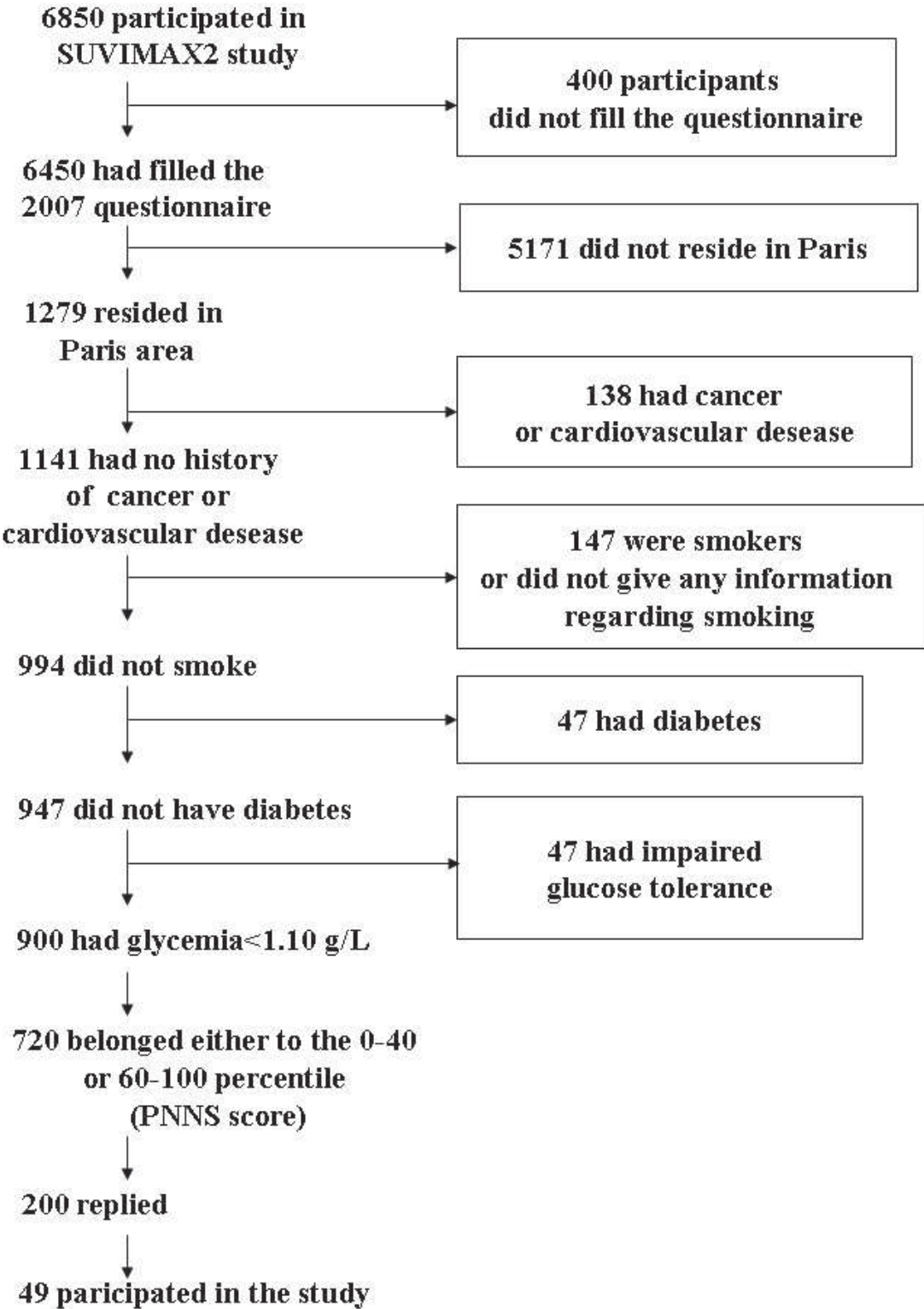


Figure 3a

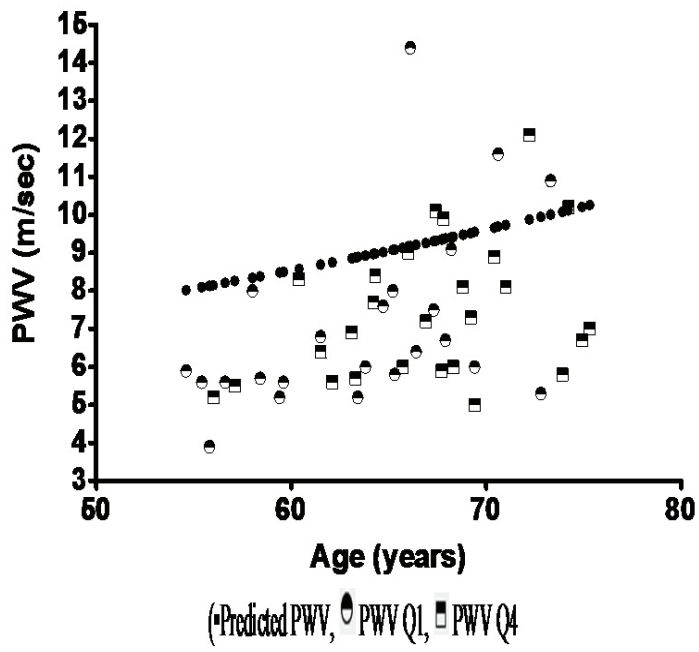
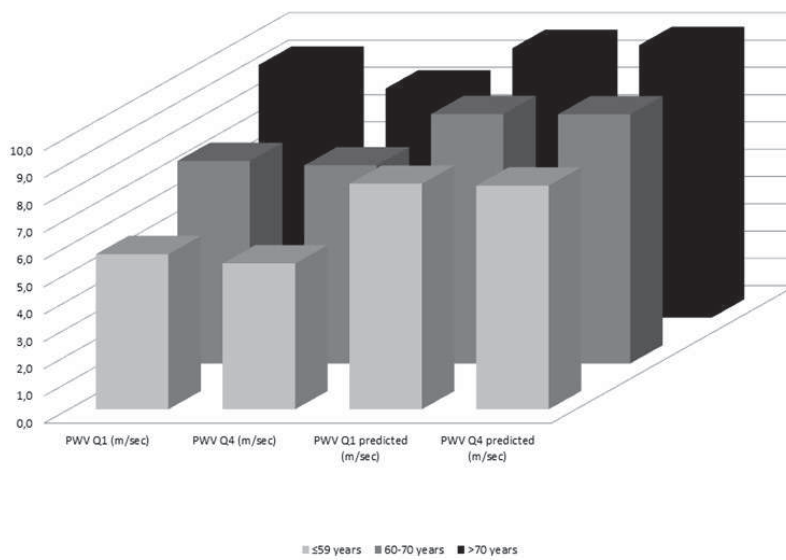


Figure 3b





**Table 1****Table 1:** Participants characteristics

	<b>Total, n=49</b>	<b>Q1, n=23</b>	<b>Q4, n=26</b>	<b>P</b>
<b>Age (years)</b>	65.4±5.6	63.6±5.6	67.0±5.2	0.036
<b>Gender (male/female)</b>	12/37	3/20	9/17	0.104
<b>Height (cm)</b>	165.1±8.6	164.4±8.0	165.8±9.3	0.583
<b>Weight (kg)</b>	64.4±13.3	60.8±12.5	67.5±13.4	0.082
<b>Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.5±3.4	22.4±3.5	24.4±3.1	0.043
<b>Waist circumference (cm)</b>	79.8±11.9	76.3±11.1	82.9±12.0	0.050
<b>Hip circumference (cm)</b>	96.9±9.5	93.8±9.6	99.6±8.7	0.033
<b>Body composition</b>				
<b>Lean body mass (kg)</b>	45.1±11.6	43.9±10.8	47.3±12.2	0.310
<b>Fat body mass (kg)</b>	18.4±5.8	16.5±4.7	20.1±6.3	0.036
<b>Physical activity score</b>				
<b>During leisure time</b>				
<b>hours ?</b>	19.2±17.9	17.3±19.1	20.9±17.0	0.532
<b>At working hours</b>	19.4±43.2	27.1±47.4	13.0±39.7	0.373
<b>At home</b>	27.7±33.8	26.8±22.0	28.6±43.8	0.904
<b>Sedentarity score</b>				
<b>Sedentarity (minutes)</b>	13697±6972	13657±6735	13728±7298	0.974
<b>Biological parameters</b>				
<b>HbA1c (%)</b>	5.4±0.3	5.5±0.2	5.4±0.4	0.568
<b>HbA1c (mmol/mmol)</b>	35.5±3.0	36.6±2.0	35.5±1.0	
<b>Fructosamine (µmol/L)</b>	233.1±21.7	227.3±21.4	238.3±21.1	0.078
<b>Glycemia (mmol/l)</b>	5.0±0.4	4.9±0.4	5.1±0.4	0.133
<b>Total cholesterol (mmol/l)</b>	6.0±0.9	5.9±0.9	6.0±0.9	0.462
<b>HDL cholesterol (mmol/l)</b>	1.9±0.7	2.1±0.9	1.8±0.4	0.261
<b>LDL cholesterol (mmol/l)</b>	3.6±0.8	3.5±0.8	3.7±0.8	0.236
<b>Triglycerides (mmol/l)</b>	1.0±0.6	1.0±0.7	1.0±0.4	0.919
<b>Urinary albumin excretion (mg/L)</b>				
	6.9±10.8	5.8±7.4	7.9±13.3	0.524

Data are means ± SD

**Table 2:** Peripheral and central blood pressures measured by applanation tonometry, indices of arterial stiffness and cardiac cycle duration.

	<b>Total, n=49</b>	<b>Q1, n=23</b>	<b>Q4, n=26</b>	<b>p</b>	<b>p #</b>	<b>p##</b>	<b>p###</b>
<b>Blood pressure</b>							
<b>Heart rate (beats/min)</b>	62.1±8.5	64.3±8.4	60.2±8.0	0.084	0.005	0.004	0.042
<b>Radial SBP (mmHg)</b>	125.3±16.2	126.3±16.8	124.4±15.8	0.676	0.039	0.014	0.091
<b>Radial DBP (mmHg)</b>	80.1±10.3	80.6±9.7	79.7±11.0	0.750	0.192	0.103	0.460
<b>Radial PP (mmHg)</b>	45.2±10.0	45.7±10.7	44.7±9.6	0.729	0.074	0.057	0.066
<b>Central SBP (mmHg)</b>	119.8±15.5	120.4±15.4	119.3±15.8	0.796	0.084	0.039	0.188
<b>Central DBP (mmHg)</b>	81.0±10.4	81.6±9.8	80.5±11.1	0.724	0.171	0.088	0.427
<b>Central PP (mmHg)</b>	38.8±9.0	38.8±8.7	38.7±9.5	0.971	0.222	0.198	0.208
<b>MBP (mmHg)</b>	97.5±12.2	98.2±12.0	96.9±12.5	0.706	0.090	0.039	0.240
<b>Pulse pressure augmentation ratio</b>	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	0.496	0.260	0.216	0.269
<b>Double product (beats*mmHg/minute)</b>	7458±1518	7788 ± 1680	7166 ±1323	0.155	0.001	<0.001	0.009
<b>Arterial stiffness</b>							
<b>PWV (m/sec)</b>	7.3±2.1	7.1±2.4	7.4±1.8	0.554	0.458	0.578	0.522
<b>Peripheral AIx (%)</b>	93.3±11.5	91.6±8.5	94.9±13.6	0.312	0.293	0.244	0.340
<b>Central AIx (%)</b>	35.7±6.6	35.3±6.1	36.0±7.1	0.720	0.556	0.517	0.447
<b>Central AIx@75 (%)</b>	29.6±6.0	30.1±5.8	29.1±6.3	0.568	0.377	0.394	0.822
<b>Reflection time (msec)</b>	138.1±9.7	137.9±10.5	138.4±9.2	0.864	0.546	0.635	0.725
<b>Cardiac cycle parameters</b>							
<b>SEVR (%)</b>	166.9±29.5	159.8±32.3	173.3±25.7	0.111	0.023	0.016	0.067
<b>Tension time index</b>	2221±388	2307±428	2145.6±489	0.147	0.002	0.001	0.018
<b>Diastolic time index</b>	3631±483	3588±483	3668.6±489	0.569	0.902	0.784	0.898
<b>Cardiac cycle (msec)</b>	983±145	947±124	1016±157	0.098	0.013	0.010	0.076
<b>Diastole duration (msec)</b>	651±132	617±117	681±139	0.090	0.015	0.011	0.078
<b>Diastole duration (% cardiac cycle)</b>	65.7±3.7	64.6±4.1	66.7±3.1*	0.049	0.011	0.008	0.049

Data are expressed as mean±SD

SBP, DBP, MBP, PP: systolic, diastolic, mean, pulse pressures, respectively; PWV: pulse wave velocity; SEVR: Subendocardial Viability Ratio;

#Covariates appearing in the model are considered at the following values (mean values for the total population): age = 65.7 years , BMI = 23.4 kg/m<sup>2</sup>.

## Covariates appearing in the model are considered at the following values: age = 65. years, waist circumference = 79.8 cm.

### Covariates appearing in the model are considered at the following values: age = 65.7 years, BMI= 23.4 kg/m<sup>2</sup>

**Table 3:** Cardiac autonomic nervous system activity and cardiac impedancemetry measurements

	Total, n=49	Q1, n=23	Q4, n=26	p	p‡	p‡‡	p‡‡‡
<i>Digital artery blood pressure measurements</i>							
SBP (mmHg)	107.2±14.8	106.0±17.7	108.2±12.0	0.622	0.310	0.323	0.331
DBP (mmHg)	69.6±12.9	67.9±14.2	71.0±11.8	0.404	0.751	0.651	0.721
MBP (mmHg)	85.4±13.0	84.2±15.0	86.5±11.1	0.545	0.472	0.438	0.456
PP (mmHg)	36.8±9.6	36.5±12.3	37.1±6.6	0.821	0.677	0.893	0.545
<i>Heart rate variability</i>							
LFnu-RRI (%)†	42.1±15.1	44.7±15.9	40.2±14.4	0.331	0.300	0.287	0.363
HFnu-RRI (%) †	57.9±15.1	55.5±15.9	59.8±14.4	0.331	0.300	0.287	0.363
LF/HF-HR †	0.8±0.5	0.9±0.6	0.8±0.3	0.228	0.272	0.301	0.680
LF-SBP (mmHg)†	39.2±11.6	39.4±12.6	39.1±11.0	0.929	0.757	0.708	0.823
<i>Cardiac impedancemetry</i>							
Stroke volume (ml)	64.5±14.9	62.5±8.0	66.1±18.8	0.403	0.370	0.369	0.464
Indexed stroke volume (ml/m <sup>2</sup> )	37.8±7.9	37.9±6.2	37.8±9.3	0.979	0.380	0.363	0.427
Cardiac output (L/min)	4.6±1.0	4.5±0.8	4.7±1.2	0.616	0.940	0.957	0.946
Indexed cardiac output (L/min*m <sup>2</sup> )	2.7±0.5	2.7±0.5	2.7±0.6	0.729	0.884	0.921	0.867
Total peripheral resistance (dyne*sec/cm <sup>5</sup> )	1508±380	1464±320	1545±426	0.464	0.680	0.687	0.957
Indexed total peripheral resistance (dyne*sec*m <sup>2</sup> BSA/cm <sup>5</sup> )	2567±672	2438±574	2676 ±739	0.225	0.722	0.779	0.930
Index of contractility (1000/sec)	41.9±14.2	43.6±13.1	40.6±15.1	0.465	0.707	0.698	0.646
Acceleration index (100/sec <sup>2</sup> )	58.8±19.9	61.1±19.2	56.9±20.6	0.472	0.567	0.582	0.513
Left ventricular work index (kg*m/m <sup>2</sup> )	3.1±0.7	3.2±0.7	3.1±0.6	0.694	0.292	0.322	0.557
Left ventricle ejection time (msec)	305.1±15.3	303.2±15.2	306.7±15.5	0.493	0.056	0.081	0.303
Thoracic fluid content (1/Ohm)	27.4±4.0	27.5±3.9	27.4±4.1	0.936	0.507	0.612	0.592

Data are expressed as mean±SD

SBP : Systolic Blood Pressure, DBP : Diastolic Blood Pressure, MAP, Mean Arterial Pressure, PP: pulse pressure, LFnu-RRI and HF nu-RRI: Low and High Frequency band of

the heart rate spectrum in normalised units expressed as percent of the total spectrum, LF/HF-HR: ratio of low to high frequency band of the heart rate spectrum, LF-SBP : Low Frequency band of systolic blood pressure spectrum. BSA: body surface area.

†measurements performed under paced breathing at 12 breaths / minute.

‡Covariates appearing in the model are considered at the following values (mean values for the total population): age = 65.4 years , BMI = 23.5 kg/m<sup>2</sup>.

‡‡ Covariates appearing in the model are considered at the following values: age = 65.4 years, waist circumference = 79.8 cm

‡‡‡ Covariates appearing in the model are considered at the following values: age = 65.4 years, BMI= 23.5 kg/m<sup>2</sup>

**Table 4:** Endothelial function in small arteries and laser Doppler results

	<b>Total. n=49</b>	<b>Q1. n=23</b>	<b>Q4. n=26</b>	<b>p</b>	<b>p‡</b>	<b>p‡‡</b>	<b>p‡‡‡</b>
<i>Endopat2000®</i>							
<b>Heart rate (beats/min)</b>	63.3±8.5	65.6±9.3	61.1±7.3	0.068	0.001	0.001	0.003
<b>Reactive hyperemia index</b>	2.3±0.5	2.3±0.5	2.2±0.4	0.895	0.813	0.620	0.444
<b>AIx (%)</b>	22.4±13.3	21.6±11.5	23.1±14.9	0.706	0.625	0.591	0.464
<b>AIx@75 (%)</b>	15.0±11.0	15.7±8.7	14.4±13.0	0.699	0.435	0.473	0.110
<i>Laser doppler</i>							
<b>Mean basal cutaneous blood flow (PU)</b>	6.6±3.04	6.6±3.5	6.7±2.6	0.878	0.902	0.839	0.377
<b>Cutaneous blood flow variation during deep breathing (%) †</b>	26.6±8.8	27.2±9.3	26.0±8.6	0.635	0.878	0.723	0.469
<i>Cutaneous blood flow after acetylcholine stimulation</i>							
<b>Maximal cutaneous blood flow (PU)</b>	46.5±30.6	38.2±21.8	54.5±35.7	0.074	0.068	0.063	0.365
<b>Peak delay (sec)</b>	0.3±0.2	0.2±0.1	0.3±0.2	0.070	0.073	0.075	0.102
<b>CBF<sub>AUC</sub> (PU*sec)</b>	118.2±31.0	104.8±32.0	131.1±24.3	0.060	0.068	0.063	0.371
<b>Peak tangent (PU/sec)</b>	4971±3054	4100±2311	5805±3475	0.123	0.090	0.082	0.344
<b>Vasodilation duration (sec)</b>	291.5±86.6	283.7±91.7	299.7±82.6	0.571	0.590	0.765	0.923

Data are expressed as mean±SD. †paced deep breathing (6/minute)

PU: perfusion units. CBF<sub>AUC</sub>: Area under the curve after acetylcholine iontophoretic administration.

‡Covariates appearing in the model are evaluated at the following values (mean values for the total population): age = 65.4 years , BMI = 23.4 kg/m<sup>2</sup>.

‡‡ Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: age = 65.4 years, waist circumference = 79.8 cm

‡‡‡ Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: age = 65.7 years, BMI= 23.4 kg/m<sup>2</sup>

### 3.2.2.3 Résultats en post prandial

#### 3.2.2.3.1 *Biologie.*

	Total (n=49, m±sd)	Q1 (N=23, m±sd)	Q4 (n=26, m±sd)	P
Glycémie H1 (mmol/L)	8,3 ± 1,5	8,2 ± 1,5	8,4 ± 1,5	0,576
Glycémie H2 (mmol/L)	6,9 ± 1,3	6,9 ± 1,3	6,9 ± 1,3	0,936
Glycémie H3 (mmol/L)	5,5 ± 0,9	5,4 ± 0,8	5,5 ± 1,0	0,684
Cholestérol total H1 (mmol/L)	5,4 ± 0,8	5,3 ± 0,8	5,5 ± 0,8	0,424
Cholestérol total H2 (mmol/L)	5,4 ± 0,8	5,3 ± 0,8	5,5 ± 0,8	0,398
Cholestérol total H3 (mmol/L)	5,7 ± 0,8	5,6 ± 0,9	5,7 ± 0,8	0,687
HDL H1 (mmol/L)	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,3	0,396
HDL H2 (mmol/L)	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,3	0,297
HDL H3 (mmol/L)	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,4	1,8 ± 0,3	0,291
LDL H1 (mmol/L)	3,3 ± 0,7	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,7	0,256
LDL H2 (mmol/L)	3,3 ± 0,7	3,2 ± 0,7	3,4 ± 0,7	0,237
LDL H3 (mmol/L)	3,5 ± 0,7	3,4 ± 0,8	3,5 ± 0,7	0,428
Triglycerides H1 (mmol/L)	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,4	0,414
Triglycerides H2 (mmol/L)	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,5	0,8 ± 0,4	0,506
Triglycerides H3 (mmol/L)	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,4	0,712

Tableau 15: *NUTRIVASC résultats biologiques en post prandial. Q1 vs Q4*

Il n'y avait pas de différence significative pour les paramètres métaboliques en post prandial entre les 2 groupes.

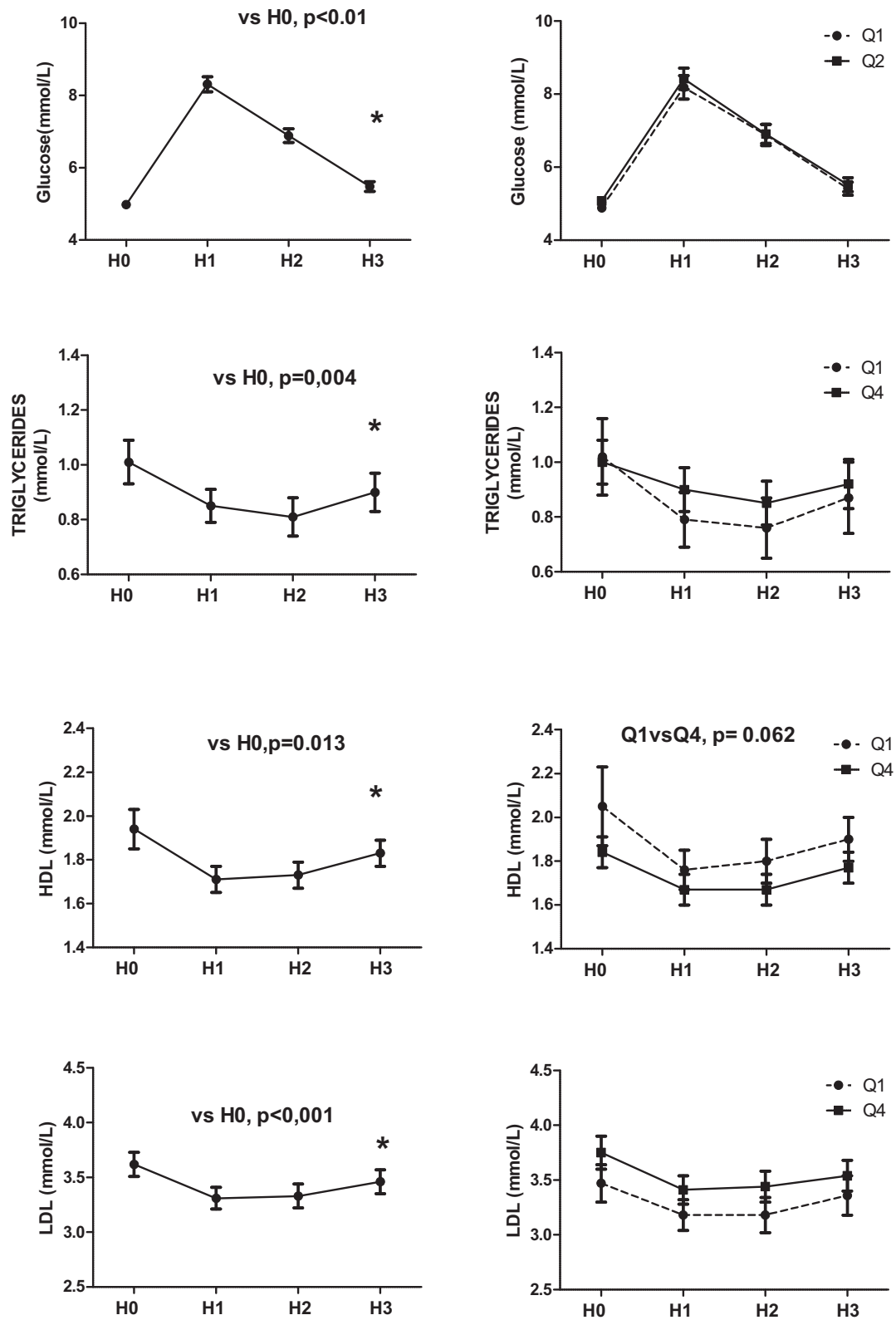


Figure 26: *NUTRIVASC Paramètres biologiques en post prandial*  
. Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3, p<0,05 vs H0.

### 3.2.2.3.2 Paramètres hémodynamiques et activité autonome cardiovasculaire.

Présentation Orale Neurodiab 2014

“Cardiovascular autonomic activity does not have an impact in postprandial hemodynamic changes in healthy elderly subjects. The NUTRIVASC study.”

L'augmentation du débit cardiaque, coïncide avec l'augmentation de la FC tandis que le volume d'éjection du ventricule gauche n'est pas modifié .

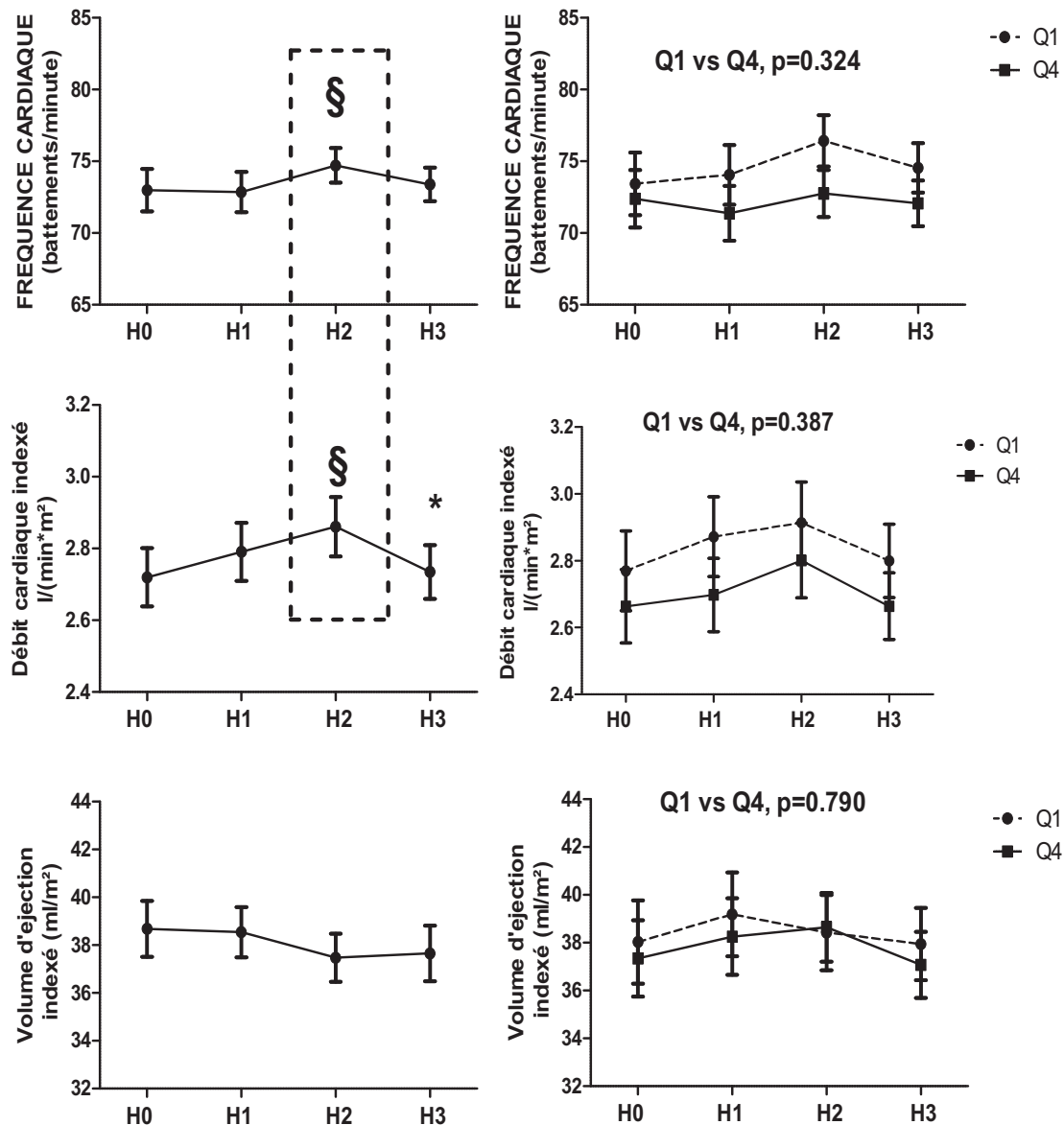
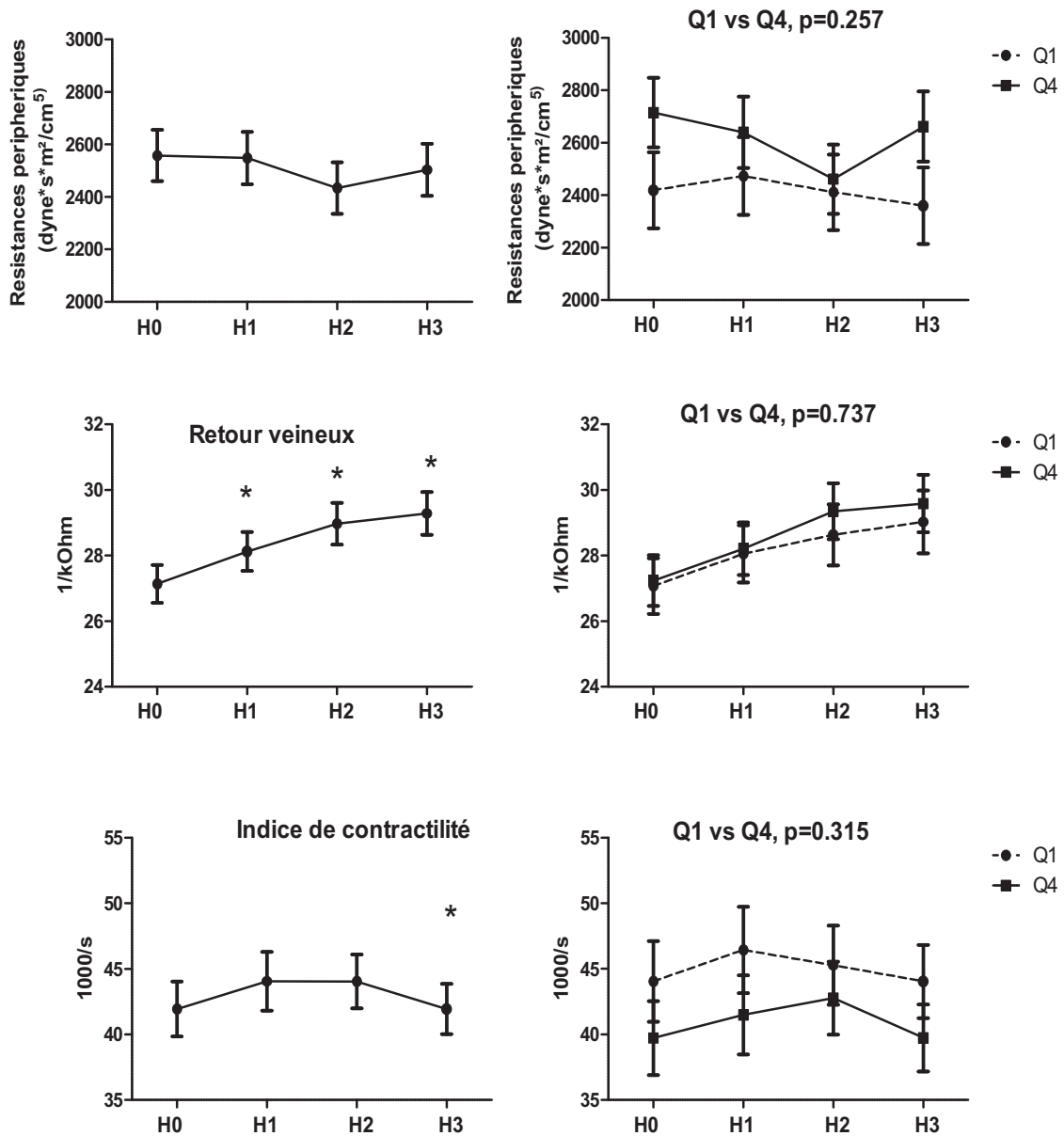


Figure 27: NUTRIVASC Modifications postprandiales de la FC, du DC, et du volume d'éjection

Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3 §, \*  $p < 0,05$  vs H0.



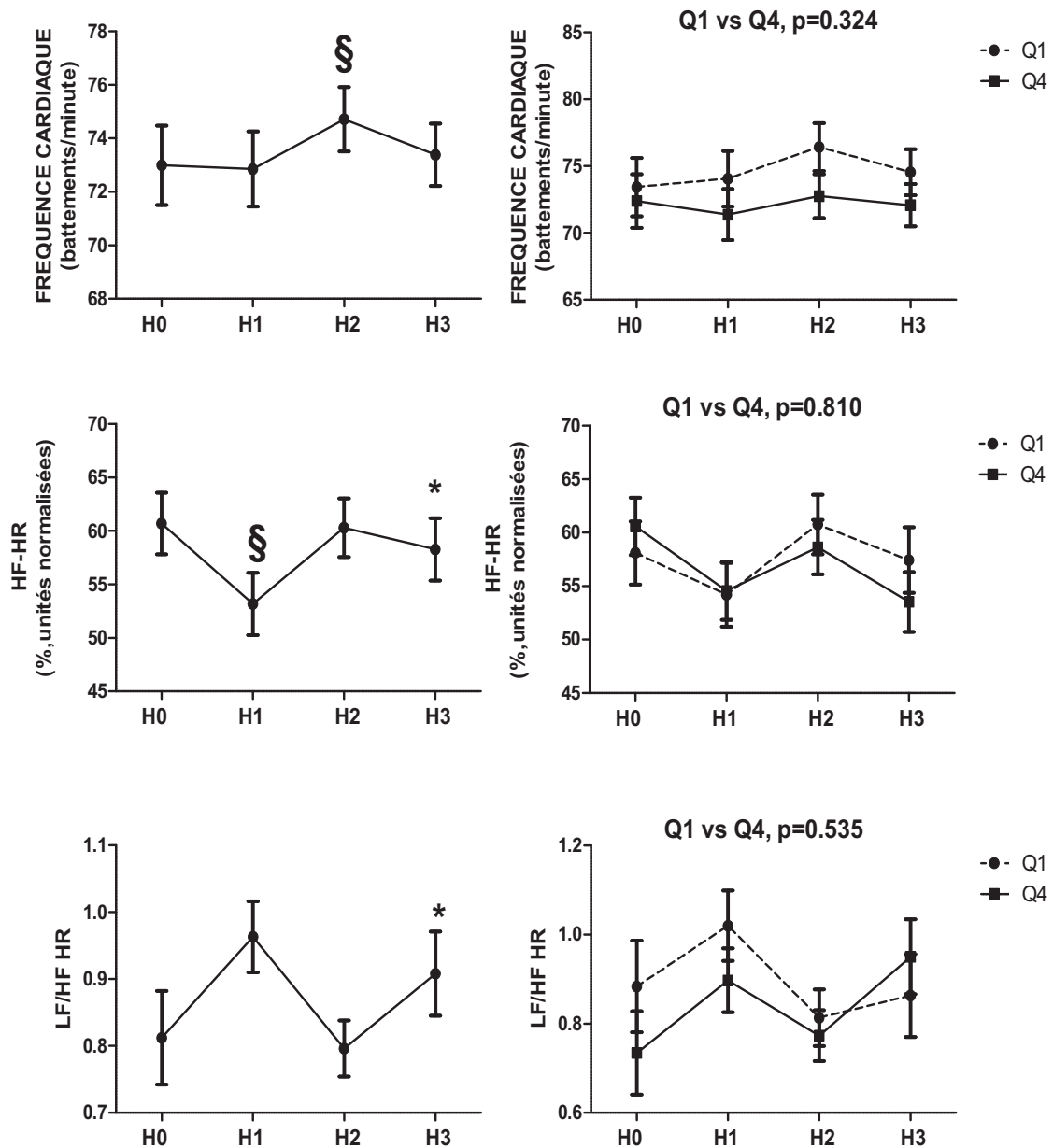
L'indice de contractilité augmente à H1, reste stable à H2 et rebaisse à H3. Le retour veineux augmente en post prandial. Les résistances périphériques ne se modifie pas de façon significative.



**Figure 28: NUTRIVASC Modifications des résistances périphériques, du retour veineux et de la contractilité cardiaque**

Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3, \*  $p < 0,05$  vs H0.

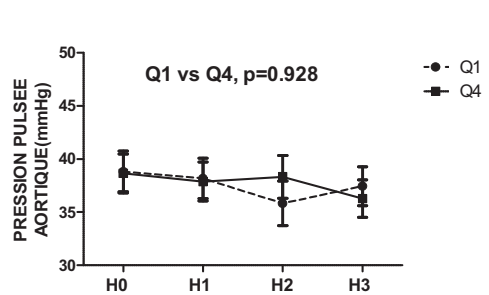
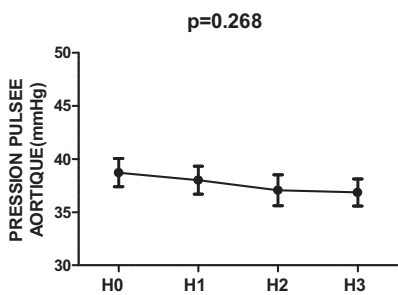
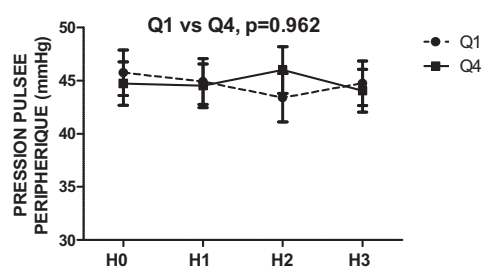
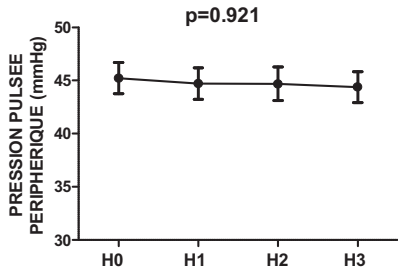
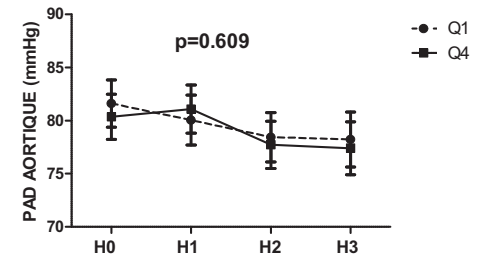
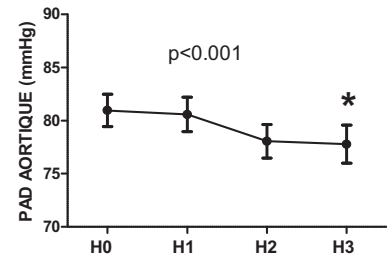
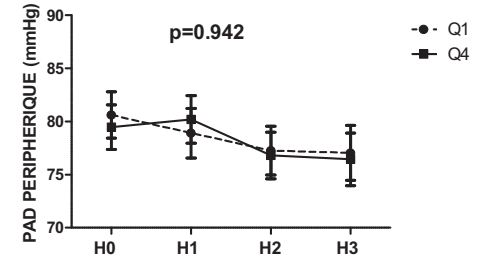
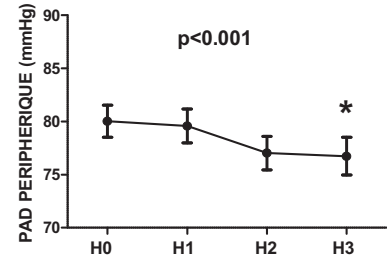
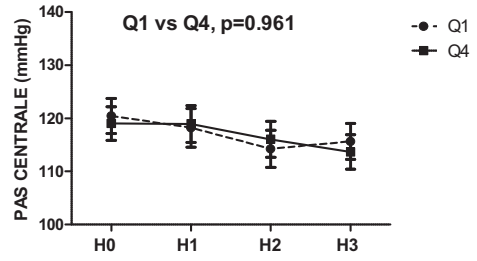
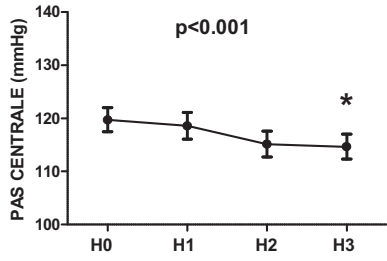
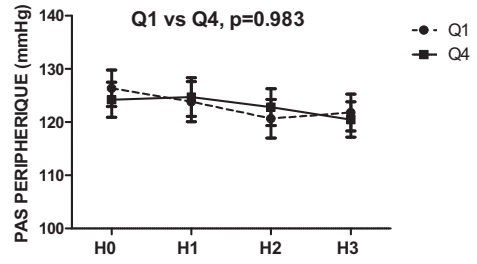
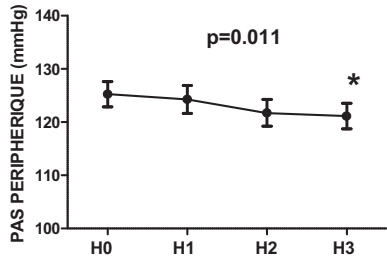
L'inhibition vagale était en événement précoce et ne coïncide pas avec l'augmentation de la FC.



**Figure 29: NUTRIVASC Les modifications de la FC ne coïncident pas avec l'inhibition vagale**  
 Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3; §, \*  $p < 0,05$  vs H0

### 3.2.2.3.3 Pression et rigidité artérielle

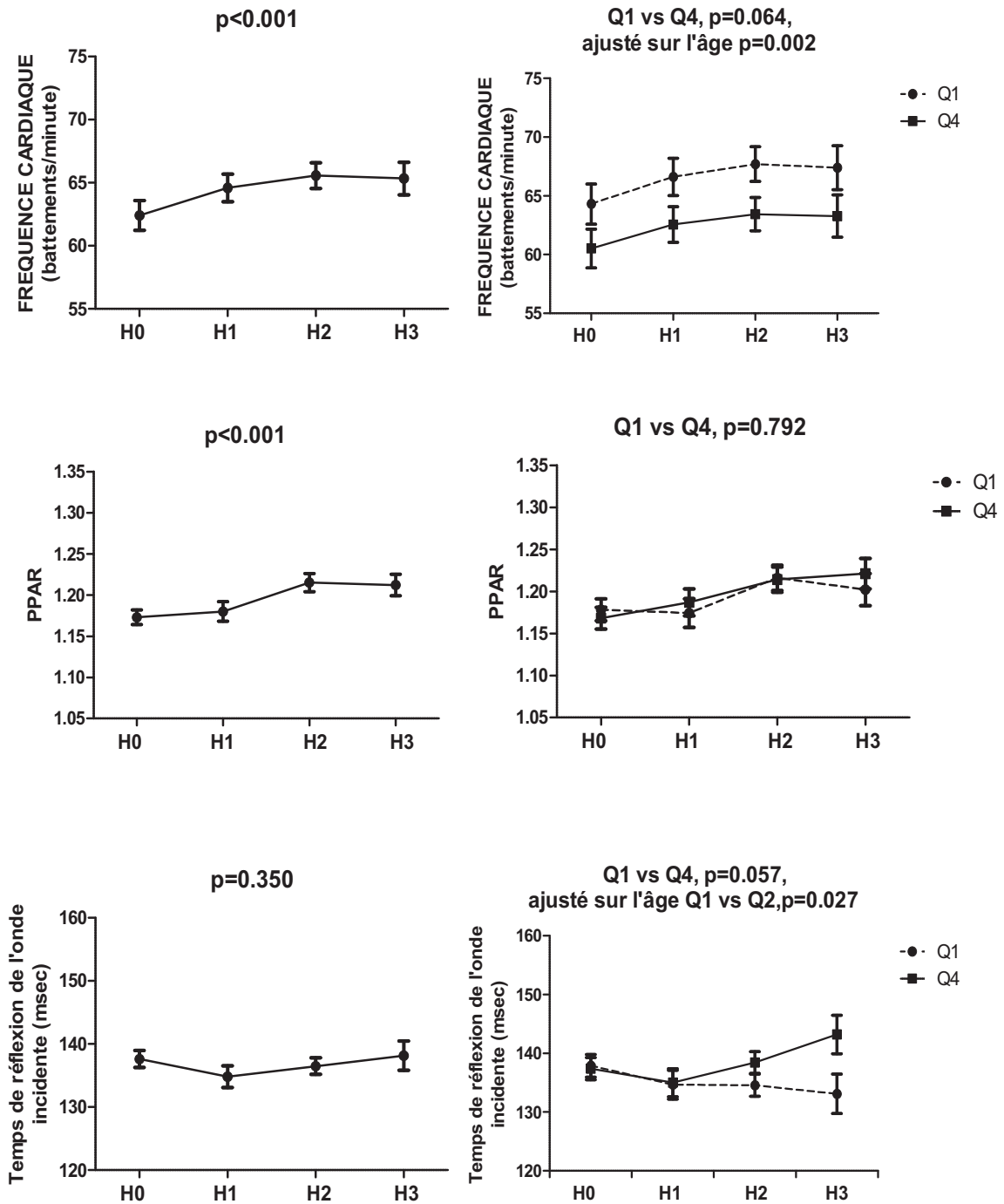
En post prandial la PAS périphérique et centrale diminuent sans modification des pressions pulsées. La diminution de la PAS arrive suite à la diminution de la PA moyenne. Les 2 groupes n'avaient pas de différences statistiquement significatives (**Figure 30**).



**Figure 30:** NUTRIVASC Modifications postprandiales de la PAS, PAD et PP périphérique et centrale. Données fournis par le Sphygmocor®.

Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3 p vs H0.

En post prandial la FC et le ratio de l'augmentation des pressions pulsées augmentent (**Figure 31**). Le sujets qui suivent les recommandations du PNNS après ajustement sur l'âge, ont une FC plus basse et un Tr plus élevé par rapport au groupe Q1.



**Figure 31:** *NUTRIVASC modifications postprandiales de la FC, PPAR et Tr*

*Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3. FC Q1 vs Q4 ajustée sur l'âge,  $p=0.002$ , Tr Q1 vs Q4 ajusté sur l'âge  $p=0.027$ .*

La rigidité artérielle (AIX et AIX@75) diminue en post prandiale et l'effet est plus important pour le groupe qui suit les recommandations PNNS ( $p=0.021$ ). La durée de la diastole et le SEVR diminuent à H1 puis augmentent à H3 de façon significative, après ajustement pour l'âge l'effet est plus important pour le groupe Q4.

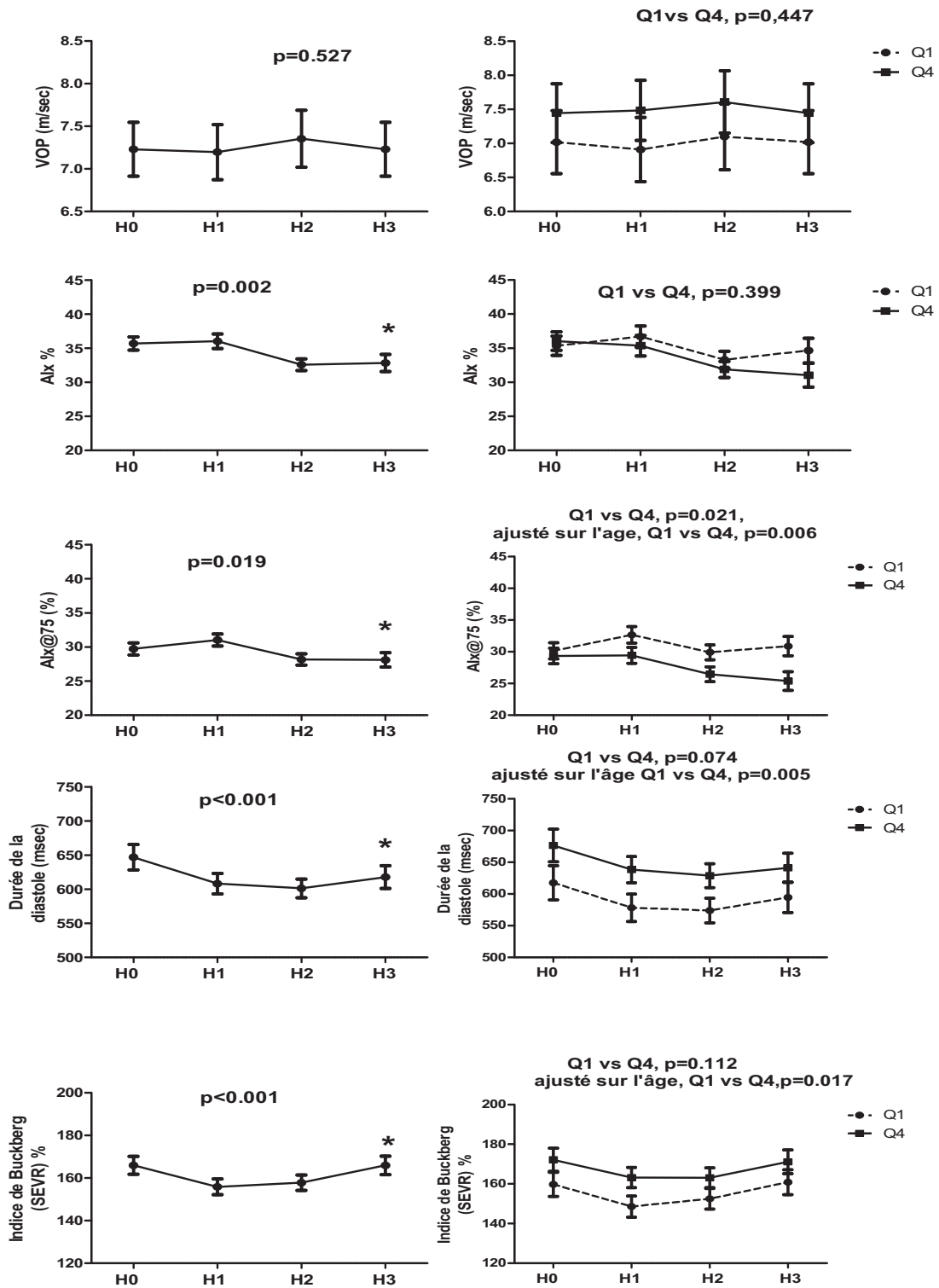


Figure 32: NUTRIVASC Modifications postprandiales de la VOP, AIx, AIx@75, SEVR, durée de la diastole Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H3 p vs H0.

### 3.2.2.3.4 Fonction endothéliale (ENDOPAT®)

En post prandial la fonction endothéliale (RHI) et la rigidité artérielle (AIx@75) diminuent de H0 à H2 sans modification des pressions pulsées. Ce profil ne diffère pas significativement entre les 2 groupes (Q1 et Q4).

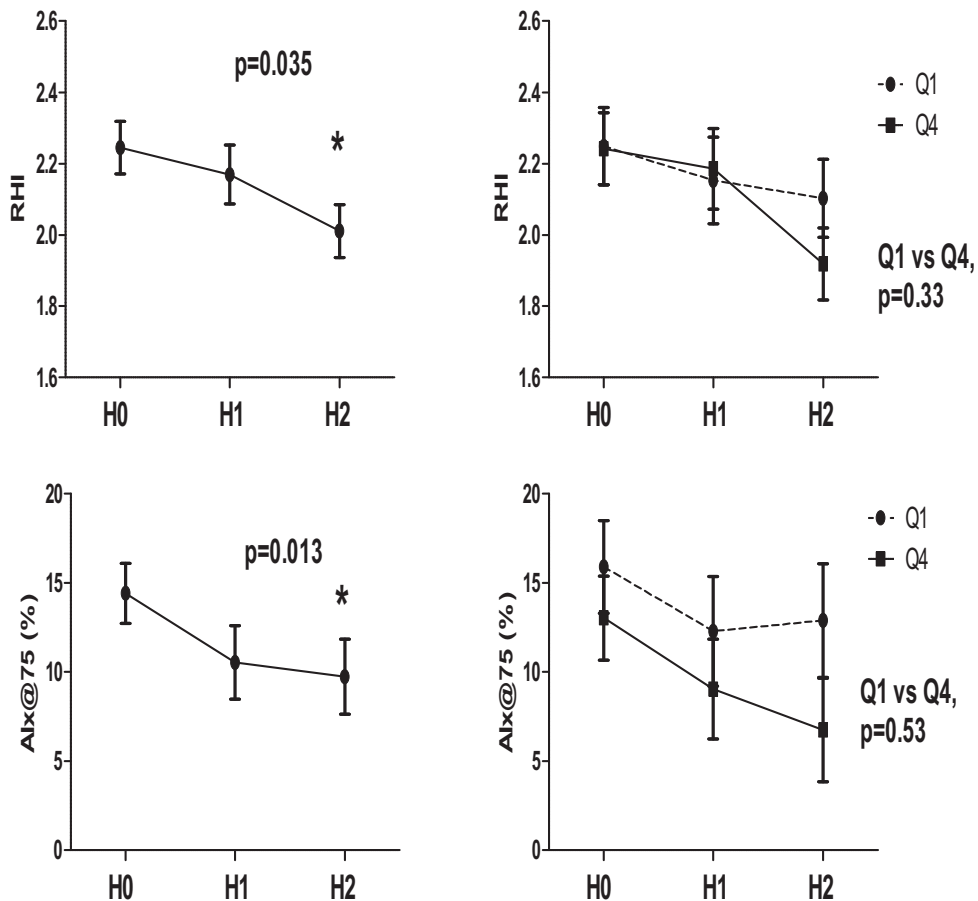


Figure 33: NUTRIVASC RHI et AIx@75.

Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H2 p vs H0. Les résultats ont été ajustés sur l'âge.

### 3.2.2.3.5 Flux sanguin cutané

Le FSC augmente en post prandial, sans différence entre Q1 et Q4. Le pourcentage de baisse du FSC pendant l'inspiration profonde (6 cycles /minute) qui est une mesure de l'activité sympathique tend à diminution.

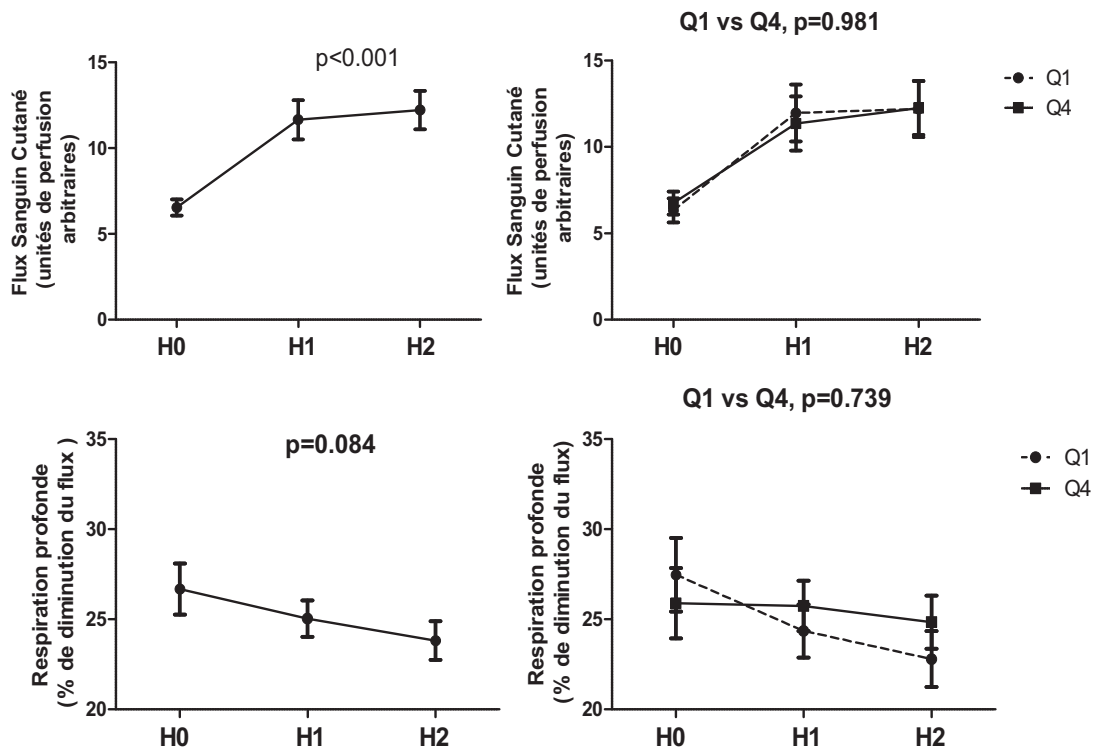


Figure 34: NUTRIVASC Flux sanguin cutané et % de variation pendant la respiration profonde

Sur la colonne de gauche tous les sujets, à droite les groupes Q1 et Q4. Anova pour mesures répétées de H0 à H2  $p$  vs H0.



### 3.2.3 Conclusions

Chez les sujets qui suivent les recommandations du PNNS à jeun la fréquence cardiaque est plus basse, la diastole dure plus longtemps et la consommation d'oxygène du myocarde est moins élevée par rapport au groupe ayant une alimentation inadéquate. Ces données suggèrent qu'une alimentation selon les recommandations peut avoir un effet bénéfique au niveau cardiovasculaire en améliorant la perfusion myocardique.

Pendant la période post prandiale chez les personnes âgées saines, l'augmentation du débit cardiaque coïncide avec l'augmentation de la FC et pas avec celle du volume d'éjection.

L'activité autonome cardiaque est modifiée très rapidement après l'ingestion d'un repas.

Les modifications la FC semblent être indépendantes d'un effet lié à l'inhibition vagale.

L'augmentation du retour veineux et du débit cardiaque est augmentée probablement par la redistribution du flux sanguin de la circulation splanchnique.

Pendant la période post prandiale les sujets qui suivent les recommandations du PNNS abaissent davantage  $A_{Ix@75}$  plus bas et ont un  $Tr$  plus élevé. Contrairement à la VOP, qui est une mesure directe de la rigidité artérielle, l' $A_{Ix}$  est une mesure indirecte de la rigidité artérielle et dépend de l'onde de réflexion. Le retour tardif des ondes de PA diminue l'amplitude de la PA systolique et pulsée centrale, la post-charge ventriculaire gauche et la demande en oxygène du myocarde.

Le groupe PNNS présente une FC dans la période post prandiale plus basse par rapport au groupe qui ne suit pas les recommandations et cette réponse est indépendante de l'activation sympathique et/ou l'inhibition vagale.

Pendant la période post prandiale nous poursuivons les analyses des données ajustés et des apports alimentaires.

### **3.3 Etude de la réponse hémodynamique physiologique post prandiale chez des patients diabétiques ayant des facteurs de risque cardiovasculaire avant et après une insulinothérapie. Etude INSUVASC.**

Effets de différents schémas d'insulinothérapie sur la compliance artérielle, la fonction endothéliale et la fonction autonome cardiaque de patients diabétiques de type 2 mal équilibrés sous traitement antidiabétique oral : une étude pilote.

**(INSULin Regimens and VASCular Functions, INSUVASC-NCT 01022658)**

#### **3.3.1 Description de l'étude**

L'activité vago-sympathique, la rigidité artérielle et la fonction endothéliale sont des intégrateurs de risque cardio-vasculaire dont les modifications concomitantes après un repas sont peu connues. En outre, l'influence respective du contrôle glycémique à jeun et post-prandial à moyen terme sur ces paramètres n'a pas été étudiée chez les diabétiques de type 2. L'objectif de cette étude pilote était de comparer les effets d'un meilleur équilibre glycémique pendant 4-5 semaines, portant sur les glycémies à jeun et/ou les glycémies post-prandiales grâce à des schémas d'insulinothérapie différents, sur la rigidité artérielle, la fonction endothéliale et l'activité du système nerveux autonome cardiovasculaire.

Il s'agit d'une étude pilote prospective, randomisée, en ouvert. Les patients étaient recrutés dans le service d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition de l'hôpital Jean Verdier (Bondy) et le service d'Endocrinologie-Maladies Métaboliques de l'hôpital Avicenne (Bobigny) et inclus après accord et signature d'un consentement éclairé.

Quarante-deux patients mal équilibrés sous traitement antidiabétique oral maximal et considérés comme insulino-requérants ont été randomisés après une demi-journée initiale d'explorations en 3 groupes déterminant leur traitement pendant 4-5 semaines : insulinothérapie au dîner ou coucher par insuline detemir (Levemir®) un analogue de longue durée d'action ou insuline d'action rapide avant chaque repas par insuline aspart (Novorapid®) ou association des deux (Basal Bolus).

Les explorations se déroulent en deux demi-journées effectuées (1) avant la randomisation, (2) après 4-5 semaines d'insulinothérapie. Au cours de chacune de ces demi-journées, étaient évalués avant et au cours des 3 heures suivant un petit-déjeuner standardisé des paramètres biologiques métaboliques, endothéliaux et du stress oxydant, la rigidité artérielle, la fonction endothéliale et le système nerveux autonome par des méthodes non invasives : Sphygmocor®,

Finapres®, laser-doppler et Endopat2000®. Une évaluation de la composition corporelle par impédancemétrie a été réalisée.

Les bénéfices attendus étaient pour les patients l'exploration très précise dans les conditions basales et après équilibration glycémique sous insulinothérapie de leurs vaisseaux et du système nerveux autonome, et l'évolution de leur masse grasse et de leur masse maigre.

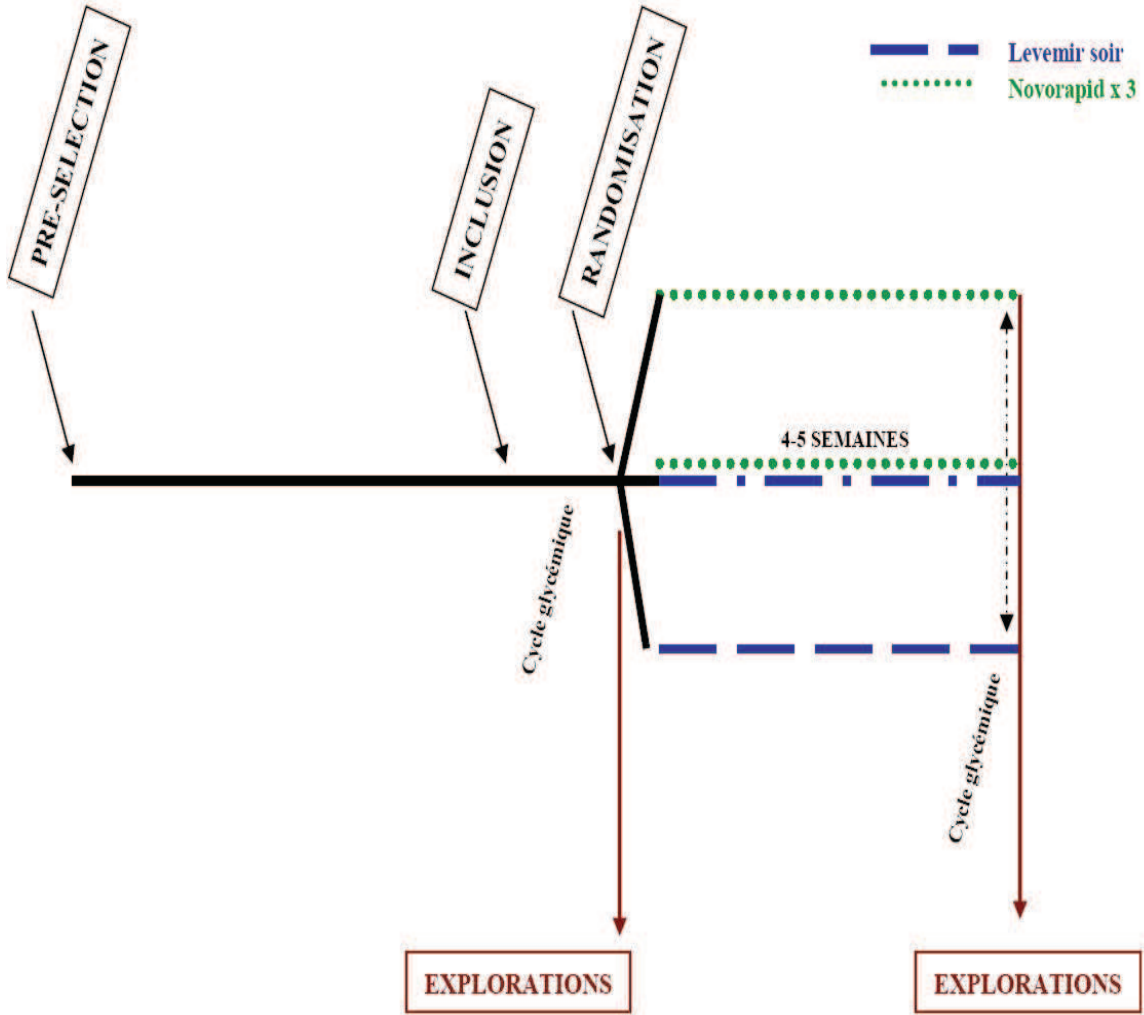


Figure 35: INSUVASC Schéma de l'étude

### 3.3.1.1 Traitement

L'insulinothérapie correspond à une des alternatives thérapeutiques recommandées actuellement en France en cas d'échec d'une bithérapie orale associant metformine et insulino-sécréteurs.

Une éducation spécifique du patient était réalisée concernant l'insulinothérapie : auto-surveillance glycémique, technique d'injection, adaptation des doses d'insuline, conduite à tenir en cas d'hypoglycémie. Cette éducation a été effectuée lors d'une hospitalisation courte, selon le patient et les habitudes du prescripteur.

Adaptation de la dose de Detemir sur la glycémie au réveil.

Seuil de glycémie au réveil	Adaptation de dose	Délai
<0,56 g/l ou hypoglycémie nuit	-4 UI ou -10%	Dès l'événement
0,56 – 0,71 g/l	-2 UI ou -5%	
0,72 – 1,00 g/l	Pas de changement	Moyenne des 3 jours
1,00 – 1,26 g/l	+2 UI	
1,27 – 1,55 g/l	+4 UI	
>1,56 g/l	+6 UI	

Adaptation des doses d'insuline Aspart injectée avant chaque repas :

Seuil de glycémie 2 heures après le repas	Adaptation de dose	Délai
<0,56 g/l ou hypoglycémie dans les 3 heures suivant l'injection	-4 UI ou -10%	Dès l'événement
0,56 – 1,00 g/l	-2 UI ou -5%	
1,00 – 1,26 g/l	-2 UI ou -5%	Moyenne des 2 jours
1,27 – 1,40 g/l	Pas de changement	
1,40 – 1,60 g/l	+2 UI ou +5%	
1,60 – 1,80 g/l	+4 UI ou +10%	
> 1,80 g/l	+6 UI ou +15%	

Le traitement par metformine était poursuivi à la dose maximale tolérée, les autres traitements anti-diabétiques étant par ailleurs arrêtés. Un éventuel traitement anti-diabétique par thiazolidinediones, inhibiteurs de l'alpha 1 glucosidase, inhibiteurs de la di-peptidyl-peptidase

4, analogues du glucagon-like peptide 1 devait être arrêté dans les deux mois précédents. Cet arrêt ne devrait pas avoir de conséquence importante sur l'équilibre glycémique, à savoir pour l'HbA1c n'aurait pas baissé de plus de 0,5% en cas d'utilisation des IAG ou d'IDPP4, pas d'efficacité de l'analogue du GLP1 a priori en raison d'une insulinopénie endogène effet rémanent pendant 8 semaines des TZD.

L'insulinothérapie débutée selon la randomisation a été poursuivie pendant 4-5 semaines, avec au minimum une aide téléphonique 3 fois par semaine pour l'adaptation des doses d'insuline la première semaine, une fois par semaine ensuite, et avec une consultation possible une fois par semaine.

Un cycle glycémique capillaire était réalisé par le patient en ambulatoire dans les 3 jours précédant les explorations, avec mesure des glycémies avant et 2 heures après le début du petit-déjeuner, du déjeuner et du dîner, et une glycémie supplémentaire à 3 heures du matin si acceptée par le patient.

Les explorations ont été réalisées après 4-5 semaines de traitement selon le schéma de la .

### **3.3.1.2 Critères d'inclusion:**

1. Patient âgé de 30 à 72 ans,
2. Diabète de type 2 diagnostiqué depuis plus d'un an,
3. HbA1c mesurée par DCA 2000 entre 7,1 et 12%,
4. Sous un traitement d'une durée de 2 mois au moins comprenant metformine et insulino-sécrétagogue (sulfamides hypoglycémiantes ou glinides) à doses maximales tolérées,
5. Index de masse corporelle entre 20 et 37 kg/m<sup>2</sup>,
6. En cas d'HTA traitée, traitement inchangé depuis 3 mois,
7. En cas de dyslipidémie traitée, traitement inchangé depuis 3 mois,

### **3.3.1.3 Critères de non inclusion:**

1. Grossesse en cours ou prévue durant les 2 mois de l'étude,
2. Femme sans contraception efficace
3. Traitement par thiazolidinediones (TZD), inhibiteurs de l'alpha 1 glucosidase (IAG) ou inhibiteurs de la di-peptidyl-peptidase 4 (IDPP4) ou analogues du glucagon-like peptide 1 (GLP1) dans les 2 mois précédant l'inclusion car des études ont suggéré un effet propre de ces traitements sur la fonction endothéliale et la rigidité artérielle, et que les effets de certains traitements pourraient être encore présents lors du premier cycle d'insulinothérapie,

4. Patient manifestement déséquilibré pour des raisons non dues au schéma thérapeutique : démotivation, refus de la maladie, erreurs diététiques manifestes, infection ou traitement intercurrent (corticothérapie), insuffisance éducative manifeste, incapacité de compréhension des règles de base du traitement,
5. Rétinopathie diabétique préproliférante ou proliférante dont la stabilisation par photocoagulation rétinienne n'est pas confirmée par l'ophtalmologiste et qui contre-indique un traitement intensif rapide de la glycémie dans les 6 mois à venir,
6. Aucune comorbidité : Hypertension non contrôlée, insuffisance rénale (clairance de la créatinine <40 ml/min), insuffisance hépatocellulaire (TP<70%), maladie respiratoire chronique, anémie (Hb<10 g/l), artériopathie oblitérante des membres inférieurs définie par une abolition de 2 pouls périphériques sur un même membre inférieur et confirmée alors par un index de pression systolique <0,8, arythmie cardiaque et extrasystoles auriculaires ou ventriculaires, troubles de la repolarisation, de troubles du rythme,
7. Patient dont le suivi sur 6 mois peut être compromis de façon prévisible (état général altéré, instabilité géographique professionnelle ou familiale),
8. Etat mental rendant le sujet incapable de comprendre la nature, les objectifs et les conséquences possibles de l'essai,
9. Sujet privé de liberté par décision administrative ou judiciaire.
10. Allergie connue à l'Insuline

#### **3.3.1.4 Organisation d'une demi-journée d'explorations**

Le jour de l'exploration, le traitement éventuel par inhibiteurs calciques, alpha- ou bêta-bloquants n'est pas pris avant les explorations mais juste à la fin des explorations. Les fumeurs éventuels ne devront pas fumer pendant la matinée. Les explorations, toutes non invasives, sont réalisées à jeun et 1, 2 et 3 heures après le petit déjeuner standardisé selon le schéma de la (**Figure 36**).

Les explorations seront réalisées si la glycémie de départ est comprise entre 0,6 et 2,5 g/L. Le cas échéant, elles sont reportées. En cas d'hypoglycémie post-prandiale pendant les explorations, celle-ci doit être corrigée par la prise de 15 g de saccharose. En cas de modifications importantes des paramètres d'étude en relation avec cette hypoglycémie et son resucrage, nous ne considérerons dans l'exploitation finale que les résultats précédant l'épisode d'hypoglycémie.

Le protocole d'une demi journée d'explorations est pratiquement le même que celui décrit pour l'étude NUTRIVASC et ACCES.

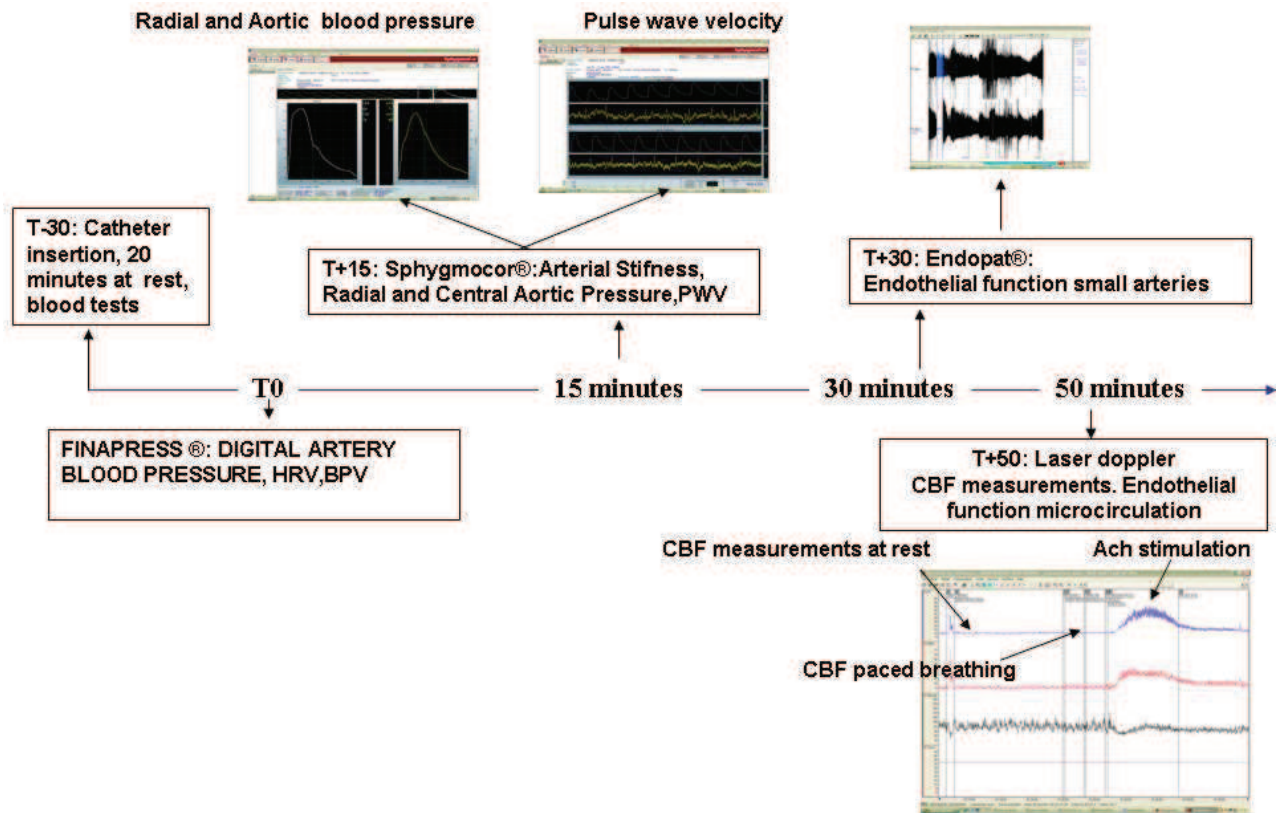


Figure 36: *INSUVASC Explorations pendant une période d'une heure.*

### **3.3.1.5 Analyses statistiques**

#### **3.3.1.5.1 *Analyse descriptive***

Tous les paramètres quantitatifs sont résumés de manière descriptive dans chaque groupe de modalité thérapeutique et pour chaque temps où ils sont recueillis. L'analyse statistique descriptive comprend pour chaque paramètre quantitatif à chaque temps : moyenne, déviation standard, minimum, maximum, médiane et quartiles, nombre de valeurs manquantes. Les paramètres qualitatifs sont exprimés par la fréquence de distribution et les intervalles de confiance bilatérale à 95% associés.

Les variables quantitatives sont comparées globalement entre les 3 groupes par ANOVA et l'effet temps par mesures répétées comparées à H0. Une transformation normalisante ou homogénéisant les variances pourra être effectuée si nécessaire. En cas d'échec une analyse sur rangs (Test de Kruskal-Wallis) sera faite.

En cas de mise en évidence d'une différence globale les groupes seront comparés 2 à 2 par test t au seuil de significativité bilatérale ajusté pour la multiplicité. Là encore, en cas de données non gaussiennes, une transformation normalisante ou une analyse sur rangs sera faite. Les paramètres qualitatifs seront comparés globalement par test de Chi-2 ou de probabilité exacte de Fisher. Des comparaisons 2 à 2 au seuil de risque ajusté seront faites en cas de différence globale significative. Aucune analyse intérimaire n'était prévue dans cette étude.

#### **3.3.1.5.2 Nombre prévu de personnes à inclure dans la recherche**

Il s'agit d'une étude pilote dans laquelle le nombre de patients inclus a été basé sur la faisabilité de l'étude. A titre indicatif, il a été calculé que N= 14 patients/ groupe permettra d'obtenir une puissance de 80% pour détecter une différence entre groupes correspondant à une taille d'effet ( $\Delta/\sigma$ ) de l'ordre de 1,1.

#### **3.3.1.5.3 Degré de signification statistique prévu**

Seuil bilatéral à 5% pour les analyses globales des 3 groupes. Seuil ajusté pour les analyses comparant chacun des groupes à un autre.

Note : Il s'agit d'une étude pilote dont les résultats devront être considérés comme exploratoires. C'est pourquoi il n'a pas été prévu d'ajustement du risque fixé à 5% (bilatéral) pour les différentes ANOVA malgré la multiplicité des paramètres testés.



### 3.3.1.6 Population

#### Caractéristiques des patients à l'entrée de l'étude

	Total (n=41)	ASPART (n=14)	BASAL BOLUS (n=13)*	DETEMIR (n=14)	p**
AGE (ANNEES)	53.8±9.6	55.8±8.5	53.4±10.3	52.1±10.3	0.60
SEXE (F/H)	21/20	8/6	10/3	3/11	0.01‡
IMC(kg/m <sup>2</sup> )	29.3±4.6	30±4.8	29.7±4.5	28.4±4.7	0.63
DUREE DU DIABETE (ANNEES)	10.5±5.5	10.5±5.2	9.2±5.9	11.6±5.6	0.52
TOUR DE TAILLE (cm)	98.9±9.1	99.5±9	97.2±7.6	99.7±10.8	0.75
TOUR DE HANCHE (cm)	104.4±9.5	106±11.4	104.2±8	103.1±9.3	0.72
GLYCEMIE A JEUNE (mmol/L)	11.3±3.1	10.9±4.1	12.3±2.3	10.7±2.8	0.38
HBA1C (%)	9±1.4	9.3±1.7	9.3±1.1	8.5±1.4	0.24
FRUCTOSAMINE (µmol/L)	351±84.5	337.1±87	367.4±58.9	349.6±103.5	0.66
C PEPTIDE(pmol/L)	795.5±374.2	790.2±401.4	869.6±378.2	732.4±360.1	0.67†
CHOLESTEROLE TOTALE (mmol/L)	4.5±1.1	4.7±1.2	4.8±1	4±1.1	0.14
HDL (mmol/L)	1.2±0.4	1.2±0.4	1.2±0.4	1.2±0.3	0.93
LDL (mmol/L)	2.5±1	2.7±1	2.7±1	2.1±1	0.21
TG (mmol/L)	1.7±0.7	1.7±0.7	1.8±0.8	1.5±0.8	0.58
ACIDES GRAS LIBRES(µmol/L)	532.7±186.4	495.6±171.4	575.7±120.7	526.7±250	0.56
MICROALBUMINURIE (mg/L)	116.4±337.9	202.9±546.7	29±44.2	117.4±197.7	0.46†
HOMA B cell (%)	57.6±36.8	73.7±48.1	44.3±16.2	55.1±35.5	0.14
HOMA S (%)	35.9±22.9	33.2±20.4	31.7±14	42.4±30.6	0.46
HOMA IR	3.6±1.7	4±2.2	3.6±1.3	3.1±1.4	0.38
DYSLIPIDEMIE (OUI/NON)	18/23	8/6	4/9	6/8	0.28‡
HYPERTENSION (OUI/NON)	18/23	6/8	6/7	6/8	0.96‡
> 2 FACTEURS DE RISQUE CV (OUI/NON)	16/25	7/7	4/9	3/11	0.56‡

‡  $\chi^2$  test      \*\* ANOVA      † APRES TRANSFORMATION LOGARITHMIQUE

**Tableau 16: INSUVASC Description de la population**

### **3.3.2 Résultats**

#### **3.3.2.1 Microcirculation: Flux sanguin cutané avant et après insulinothérapie**

##### **Short-term effects of insulin analogs Aspart and Detemir as an add-on to metformin on cutaneous 3 microcirculatory perfusion after failure to treatment with oral antidiabetic agents**

**(article soumis à publication )**

#### **Etude Insuvasc. Flux sanguin cutané**

#### **3.3.2.2 Introduction**

Le flux sanguin cutané (FSC) est un modèle accessible pour l'étude des mécanismes des maladies cardiovasculaires. La mesure du FSC est non invasive et représente un indice de la fonction microcirculatoire de la peau, mais également d'autres lits vasculaires [511]. La mesure du FSC a été utilisée afin d'évaluer la maladie vasculaire périphérique [136] et la maladie coronarienne athérosclérotique [137].

L'insuline induit un recrutement capillaire dans la peau humaine chez des sujets normoglycémiques en bonne santé, un processus qui augmente à la fois la vasodilatation de la microcirculation de la peau et l'activité endothéliale locale [122]. La vasomotion postprandiale induite fournit les substrats nécessaires pour les cellules. Toutefois, les changements du FSC postprandial peuvent varier en fonction de l'approche utilisée au cours des études. Par exemple, la perfusion microvasculaire augmente au cours d'un clamp normoglycémique hyperinsulinémique, mais reste inchangé après un repas mixte chez les individus sains et chez les patients obèses. Il a été suggéré que l'hyperinsulinémie résultant de la résistance à l'insuline peut réduire la fonction microvasculaire même avant l'apparition du diabète.

Les analogues de l'insuline ont un début d'action plus précoce que l'insuline humaine et peuvent mieux réduire les excursions glycémiques post-prandiales. Ces nouvelles formulations sont plus efficaces pour le traitement de l'hyperglycémie aiguë et inhibent la production de radicaux libres et le stress oxydatif. Comparativement à l'insuline humaine elles peuvent également restaurer le flux microvasculaire postprandial chez les patients atteints de diabète de type 1. Cependant, l'effet à court terme sur le FSC dans la période post-prandiale après l'initiation du traitement par les analogues de l'insuline ajoutés à la metformine n'est pas connu chez les patients diabétiques de type 2. Le but de cette étude était d'examiner les changements du FSC et de la fonction microcirculatoire endothéliale chez les patients diabétiques de type 2 mal contrôlés à jeun et après un petit déjeuner standard sous trois schémas d'insuline différents. Nous avons fait l'hypothèse que le traitement à l'insuline de longue durée d'action, d'action rapide ou selon un schéma basale bolus ajouté à la metformine, apporteront une amélioration supplémentaire du FSC respectivement soit à jeun ou après un repas, ou les deux.

### **3.3.2.3 Patients**

L'étude INSUVASC était une étude pilote, randomisée, en ouvert avec trois bras qui a été menée au CHU Jean Verdier, Bondy, France. L'étude a été approuvée à la fois par le comité d'éthique local (RPC, Comité de Protection des Personnes) et par l'Agence Nationale Française de Sécurité du Médicament et a été enregistrée comme un essai clinique (NCT01022658).

### **3.3.2.4 Mesures des fluctuations spontanées du flux sanguin par laser doppler**

Le dispositif de *Periflux System 5000*® Doppler laser avait une fréquence d'échantillonnage de 32 Hz, 780 nm de longueur d'onde, largeur de bande de 10 Hz à 19 kHz, et le signal a été traité avec la version 2.5.5 du logiciel Perisoft. Les mesures du Doppler laser ont été enregistrées sur la partie inférieure de la face intérieure de l'avant-bras en position couchée. Le FSC a été mesuré en unités arbitraires de perfusion. L'étalonnage de la sonde laser a été fait sur une surface blanche uniforme.

Le FSC a été mesuré à chaque période (H0, H1, H2) de la manière suivante: pendant six minutes au repos en respiration spontanée, puis pendant 1 minute de respiration profonde à une fréquence de 6 cycles / minute. Après 1 minute de repos, l'acétylcholine (Ach, Miochole®, Novartis) a été appliqué dans une éponge imbibée de 0,2 ml d'une solution d' Ach à 2% autour de la chambre de la sonde Doppler laser.

L'administration cutanée de l'Ach a été réalisée par iontophorèse (0,2 m de Amp pendant 25 sec) et le FSC a été mesuré au moins pendant 6 minutes après l'administration Ach.

### **3.3.2.5 Dosages biochimiques**

La glycémie a été mesurée sur le plasma veineux par le méthode de glucose-oxydase (colorimétrie, Kone Optima, Système Thermolab, Paris La Défense, France). Le mesure de l'HbA1c a été basée sur une dosage immunologique (technologie Dimension®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, Etats-Unis). Le cholestérol total, des lipoprotéines de haute densité (HDL) et les triglycérides ont été mesurés par la colorimétrie enzymatique (Hitachi 912, Roche Diagnostic, Meylan, France). Les lipoprotéines de basse densité (LDL) ont été calculé en utilisant la formule Friedwald (sauf chez des patients qui avaient une concentration des triglycérides > 400 mg / dl). L'excrétion urinaire d'albumine a été mesurée

par immunonéphélométrie laser (BN100; Dade Behring) et les acides gras libres avec colorimétrie enzymatique (Wako Chemicals, GmbH).

### 3.3.2.6 Analyse du FSC.

Le FSC diminue pendant l'inspiration, en raison de l'activation sympathique. Le pourcentage de diminution du zénith au nadir de l'ondelette de signal a été calculé, et la diminution moyenne au cours des trois derniers cycles respiratoires a été utilisée comme un indice de réponse microvasculaire de l'activation sympathique (24). Les mesures après l'administration Ach étaient les suivants (**Figure 37**): (i) FSC maximal après l'administration d'Ach (FSC maximal), (ii) temps depuis le début de l'administration Ach jusqu'au FSC maximal (délai du pic FSC), (iii) aire sous la courbe de la FSC pendant 3 minutes à partir du début de l'administration Ach (AUC) qui est considéré comme un marqueur de la fonction microvasculaire endothéliale, (iv) tangente du FSC maximale (augmentation de la tangente : accélération de la perfusion tissulaire) et (v) durée de la vasodilatation depuis le début de l'administration Ach jusqu'au retour à un niveau 20% au dessus du FSC de base.

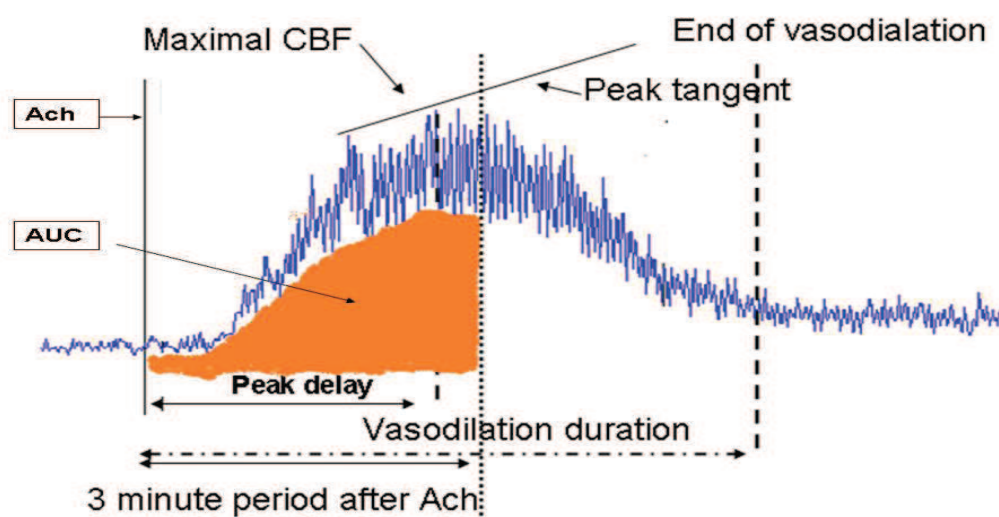


Figure 37: INSUVASC analyse du FSC

### 3.3.2.7 Résultats

Quarante-deux patients DT2 ont été inclus. Un patient a été exclu pour une déviation du protocole, un deuxième patient a retiré son consentement et pour six patients nous avons été obligés d'arrêter le test car ils devaient se rendre aux toilettes.

À la fin de l'étude, 34 patients (Aspart : n = 8, Detemir : n = 13, Aspart/Detemir : n = 13) ont eu des enregistrements de bonne qualité des mesures doppler laser à 6 périodes (H0, H1 et H2 pour V1 et V2). Seules les données pour ces 34 patients seront présentées. Au départ les trois groupes de traitement ne présentaient pas de différence statistiquement significative pour l'âge, l'IMC, le sexe ou la durée du diabète.

#### 3.3.2.7.1 *Traitement par insuline*

A V2, la dose quotidienne totale d'insuline était de  $0,56 \pm 0,29$  UI / kg de poids corporel dans le groupe Aspart,  $0,45 \pm 0,20$  UI / kg, dans le groupe Detemir et  $0,75 \pm 0,44$  UI / kg dans le groupe Aspart / Detemir ( $p = 0,071$ ). Six épisodes hypoglycémiques modérés sont survenus au cours de la période de 4 semaines de traitement à l'insuline, mais pas d'hypoglymie sévère entre la V1 et la V2.

#### 3.3.2.7.2 *Paramètres métaboliques*

A V1, l'HbA1c chez les 34 patients était de  $9,0 \pm 1,4\%$ . Il existe une diminution de l'HbA1c et la fructosamine après traitement à l'insuline dans chaque groupe il y avait une diminution de l'HbA1c et de la fructosamine. Cet effet était plus prononcé chez les patients traités par Aspart seul ou en combinaison avec detemir ( $p$  pour l'interaction  $0,0004$  pour HbA1c et  $0,014$  pour la fructosamine). La glycémie et le peptide C ont diminué entre V1 et V2, à jeun et une et deux heures après le petit déjeuner ( $p < 0,001$  pour tous) sans différence entre les groupes. Les taux de peptide C ont diminués de 2 heures après le repas  $20,7\%$  dans le groupe detemir,  $11,9\%$  dans le groupe Aspart et  $44\%$  dans le groupe Aspart / detemir ( $p$

pour l'interaction = 0,0266). Les taux de cholestérol LDL différaient entre les trois bras de traitement, sans modification entre V1 et V2, et sans interaction. Le cholestérol HDL a augmenté, alors que les triglycérides et les acides gras libres ont diminué entre V1 et V2 tant à jeun qu'après les repas, avec une interaction entre le traitement et le temps des effets: les acides gras libres ont diminué à jeun chez les patients traités par detemir et après le petit déjeuner chez ceux traités par Aspart.

### **3.3.2.7.3** *FSC à jeun et post prandial avant la randomisation (V1)*

Par rapport la période de jeûne (H0), FSC a augmenté après le petit déjeuner à H1 et H2 (+ 36,9 % et + 45,6 %, respectivement;  $p < 0,001$  pour les deux), la diminution du FSC pendant la respiration profonde était plus forte à H1 et H2 ( $p = 0,024$ ). Après le petit déjeuner, le FSC après stimulation par Ach a augmenté : le FSC maximal, le délai du pic, l'AUC et la durée de la vasodilatation étaient plus élevés qu'à jeun ( $p < 0,05$ ).

### **3.3.2.7.4** *Changements du FSC après 4 semaines de traitement par l'insuline (V2)*

À jeun (H0), il n'y avait aucun changement significatif du FSC basal ni du pourcentage de diminution du FSC pendant la respiration profonde après un traitement à l'insuline, quel que soit le groupe de traitement à l'insuline. Le FSC maximal ( $p = 0,039$ ) et le FSC AUC ( $p = 0,019$ ) ont augmenté après traitement à l'insuline, sans qu'il n'y ait de différence entre les bras Aspart, Detemir et Aspart / Detemir

Le FSC maximale ( $p = 0,039$ ) et le FSC AUC ( $p = 0,019$ ) a augmenté après un traitement à l'insuline, sans qu'il y ait de différence entre les bras Aspart, Detemir et Aspart / Detemir

Le flux maximal après Ach a également augmenté une heure après le petit déjeuner (à H1) après traitement par l'insuline ( $p = 0,044$ ), sans différence entre les trois bras groupes

Deux heures après le petit déjeuner (à H2), il n'y avait pas de modification notable des paramètres étudiés après traitement à l'insuline (visite 1) et après le traitement à l'insuline (visite 2) par rapport à V1.

#### **3.3.2.7.5** *Marqueurs biologiques du stress oxydatif et de la fonction endothéliale*

Les marqueurs de stress oxydatif, LDL oxydés et nitrotyrosine, n'étaient pas modifiés à jeun et en post prandial après traitement à l'insuline. Les taux plasmatiques à jeun et post prandila des marqueurs de l'activation endothéliale (E- sélectine et VCAM - 1) ont diminué après traitement à l'insuline à jeun ., sans difference significative entre les 3 groupes.

#### **3.3.2.7.6** *Les corrélations des changements du CBF et des paramètres métaboliques*

Nous avons testé la corrélation de la différence ( $\Delta$  : Delta) entre la période de jeûne et 2 h après le petit déjeuner pour le FSC et les paramètres métaboliques. Le  $\Delta$ glycémique ( $\beta = 0,415$ ,  $P = 0,020$ ) et les acides gras libres ( $\beta = -0.428$ ,  $p = 0,023$ ) corrélaient de façon significative avec  $\Delta$ FSC. Les  $\Delta$ Tg,  $\Delta$ LDL et  $\Delta$ glucagon n'étaient pas. Après 4 semaines de traitement à l'insuline (V2), l'association entre  $\Delta$ FSC et les deltas de paramètres métaboliques n'était plus significative

#### **3.3.2.8 Discussion**

L'étude INSUVASC a montré que l'insuline Aspart, Detemir ou leur combinaison après un traitement de 4 semaines en ajout à la metformine chez des patients diabétiques de type 2 insuffisamment contrôlés par la metformine et une sulfonylurée, améliore la fonction endothéliale microvasculaire à jeun. Cependant le traitement par les analogues de l'insuline n'a eu pratiquement aucun effet supplémentaire sur le FSC basal ni à jeûn ni après les repas, comparativement à la metformine seule.



Après un traitement à l'insuline de 4 semaines la glycémie à jeûn et post-prandiale, l'HbA1c et la fructosamine se sont notablement abaissés comme prévu. Tous ces changements métaboliques ont été réalisés précédemment et ont peut-être joué un rôle dans l'amélioration de la fonction endothéliale.

Le stress oxydatif est considéré comme le principal mécanisme pour la dysfonction endothéliale vasculaire suite à une hyperglycémie. Dans notre étude le traitement par insuline comme un ajout à la metformine n'a pas diminué la nitrotyrosine à jeûne d'une manière significative. La réduction du stress oxydatif est susceptible d'être impliquée dans l'amélioration de la fonction endothéliale. Ces données suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués.

Nos patients en dépit de leur mauvais contrôle glycémique et une élévation marquée de la glycémie après le petit déjeuner, ils ont présenté au cours de la période post-prandiale une augmentation du FSC, une amélioration de la fonction endothéliale stimulée par l'Ach, une diminution des marqueurs de la dysfonction endothéliale (sélectine E et VCAM-1), une augmentation de la réduction du pourcentage du FSC lors de l'activation sympathique induite par la respiration profonde. Ainsi, la vasoréactivité a été améliorée après le petit déjeuner standard, probablement à la suite d'une augmentation de l'insuline endogène telle que suggérée par l'élévation marquée du taux de peptide C. Nos résultats suggèrent que, malgré un mauvais contrôle glycémique chez les patients diabétiques de longue date, la metformine joue un rôle majeur dans la préservation de l'amélioration postprandiale de la vasomotricité, à travers des mécanismes qui doivent être spécifiquement étudiés, y compris un effet antioxydant et une amélioration de la signalisation de l'insuline.

Nous avons également observé une diminution des marqueurs d'activation endothéliale, la Selectine E et VCAM-1, à jeûne et après un traitement à l'insuline. Cet effet bénéfique du traitement à l'insuline sur les biomarqueurs endothéliaux a été déjà publié par notre groupe et a également été décrit pour les analogues de l'insuline à action prolongée. La réponse similaire dans les trois groupes de traitement suggère que cet effet n'est pas lié à l'action

rapide de l'insuline, mais à l'hormone se dotant de cette manière une diminution supplémentaire de l'activation endothéliale lorsqu'il est combiné à la metformine. Cet effet peut également être lié à la diminution des taux de glucose et d'autres métabolites comme les triglycérides ou les acides gras libres et à la diminution du stress oxydatif.

Les points forts de notre étude sont que 1) le traitement à l'insuline a été affecté de manière randomisée en éliminant de cette manière le biais dans l'affectation du traitement, 2) l'effet supplémentaire de ce traitement pourrait être évalué avec un repas où seule avec la metformine comme un contrôle et 3) la présence de trois groupes de traitement a fourni l'occasion d'étudier l'effet à la fois les analogues de longue durée d'action et des analogues d'action rapide. L'étude avait quelques points faibles: bien que les paramètres métaboliques ont été améliorés, le temps relativement court de l'étude ne nous permette pas d'atteindre un contrôle glycémique parfait, la conception de l'étude était ouverte marqué pour rendre possible l'ajustement de la dose d'insuline ; enfin les effets non endothélial dépendants n'est pas testé en utilisant le nitroprussiate de sodium.

En conclusion, chez les patients atteints d'un diabète de type 2 ancien et d'un mauvais contrôle glycémique, mais ayant une faible prévalence des complications microangiopathiques, la vasoréactivité en réponse à l'Ach a été améliorée et les marqueurs de dysfonction endothéliale ont diminué après 4-5 semaines d'équilibre glycémique par d'insulinothérapie.

L'effet endothélial favorable observé après une injection unique d'insuline se trouve ici confirmé après un traitement de plusieurs semaines. L'amélioration métabolique peut jouer un rôle déterminant mais l'effet propre de l'insuline mériterait d'être examiné dans une autre étude à plus grande échelle.

1 Short-term effects of insulin analogs Aspart and Detemir as an add-on to metformin on cutaneous  
2  
3 microcirculatory perfusion after failure to treatment with oral antidiabetic agents  
4  
5  
6

7  
8 **Author Block:**  
9

10 Marinos Fysekidis<sup>1,2</sup>, Emmanuel Cosson<sup>1,2</sup>, Karim Takbou<sup>1</sup>, Angela Sutton<sup>3</sup>, Nathalie Charnaux<sup>3</sup>,  
11  
12 Isabella Banu<sup>1</sup>, Eric Vicaut<sup>4</sup>, Paul Valensi<sup>1</sup>  
13  
14

15  
16  
17 1) AP-HP, Jean Verdier Hospital, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Department of  
18  
19 Endocrinology-  
20

21 Diabetology-Nutrition, CRNH-IdF, CINFO, Bondy, France.  
22

23  
24 2) Sorbonne Paris Cité, UMR U1153 Inserm / U1125 Inra / Cnam / Université Paris 13, Bobigny, France  
25

26  
27 3) APHP, Jean Verdier Hospital, Biochemistry Department, Bondy, France.  
28

29  
30 4) Clinical Research Unit, Lariboisière-St Louis, Fernand Widal Hospital, APHP, Paris, France  
31

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Corresponding Author: Professor Paul VALENSI

Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, Jean Verdier Hospital, avenue du 14 Juillet,

93143 Bondy cedex, France

☎ (Int)+33 (0)148026380

☎ (Int)+33 (0)148026356

✉ paul.valensi@aphp.fr

**Keywords:** endothelial function, acetylcholine iontophoresis, cutaneous microcirculation, insulin analog treatment, postprandial cutaneous blood flow, laser Doppler flowometry.

Short running title: Insulin as an add-on to metformin

Word count : 4116

number of tables: 3

number of figures: 3

**List of abbreviations**

CBF: Cutaneous blood flow

INSUVASC: INSULin Regimens and VASCular Functions

Ach: Acetylcholine

AUC : area under the curve

VCAM-1:Vascular cell adhesion molecule-1

ANOVA: analysis of variance

1 **Abstract:**  
2  
3  
4

5 **Background**  
6  
7

8 Our aim was to examine the effects of three randomly assigned insulin analog regimens (Detemir,  
9  
10 Aspart, and their combination) on cutaneous blood flow (CBF) as an add-on to metformin in secondary  
11  
12 failure to oral antidiabetic agents.  
13  
14

15 **Methods**  
16  
17

18 Forty two type 2 diabetic patients with no history of cardiovascular disease in secondary failure to oral  
19  
20 antidiabetic agents had CBF measurements at rest and after acetylcholine (Ach) iontophoretic  
21  
22 administration. Tests were performed at fasting and after a standardized breakfast during the post-  
23  
24 prandial period. Before randomization (Visit 1, V1) during the tests, participants took only metformin.  
25  
26 The same tests were repeated after 4 weeks of insulin treatment (Visit 2, V2).  
27  
28

29 **Results**  
30  
31

32 Thirty four patients had good quality recordings for both visits. During V1, CBF increased at rest and  
33  
34 after Ach in the post-prandial period. After 4 weeks of insulin treatment, metabolic parameters  
35  
36 improved. Compared to V1, CBF at fasting did not increase at V2 but there was an improvement in  
37  
38 endothelial function at fasting after Ach iontophoresis, without differences among insulin regimens.  
39  
40 Insulin analog treatment had no effect on basal CBF post-prandially. Oxidative stress markers were not  
41  
42 modified and E-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 levels decreased after insulin treatment,  
43  
44 without differences among insulin groups.  
45  
46  
47  
48

49 **Conclusions**  
50  
51

52 The addition of insulin treatment for a short period in patients with type 2 diabetes improved systemic  
53  
54 endothelial function and microcirculatory endothelial reactivity at fasting. Insulin treatment and  
55  
56 glycemic control provided little improvement in microvascular function during the post-prandial period  
57  
58 with similar results among insulin regimens.  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Introduction

1  
2  
3 Cutaneous blood flow (CBF) is an accessible model for the study of microvascular disease. CBF is  
4  
5 measured in a non-invasive way and represents an index of the microcirculatory function not only of the  
6  
7 skin but also other vascular beds [1]. CBF has been used to assess peripheral vascular [2] and  
8  
9 atherosclerotic coronary artery disease [3].

10  
11  
12 Insulin induces capillary recruitment in human skin in healthy normoglycemic subjects, a process that  
13  
14 increases both vasodilatation in skin microcirculation and local endothelial activity [4]. The induced  
15  
16 post-prandial vasomotion then provides necessary substrates for all tissue layers [5]. However, post-  
17  
18 prandial CBF changes may vary depending on the approach used during each study. For example,  
19  
20 prandial CBF changes may vary depending on the approach used during each study. For example,  
21  
22 microvascular perfusion increased during steady-state hyperinsulinemia elicited by an insulin clamp, but  
23  
24 perfusion did not change after a mixed meal in healthy individuals or in obese patients [6]. It has been  
25  
26 suggested that hyperinsulinemia resulting from insulin resistance may reduce microvascular function  
27  
28 even before the appearance of diabetes [7, 8]. In obese patients, post-prandial microvascular function is  
29  
30 impaired due to a defect in insulin-stimulated microvascular vasomotion [9]. Obesity seems to alter  
31  
32 microcirculation independently from hypertension and type 2 diabetes as well as in the absence of  
33  
34 endothelial dysfunction, thus underlining the precocious nature of these microcirculatory changes [10,  
35  
36  
37  
38  
39  
40 11].

41  
42 Metformin and insulin combination is known to improve glycemic control in type 2 diabetes [12-14] and  
43  
44 can be used early in the course of the disease [15]. In patients with metabolic syndrome, metformin  
45  
46 treatment improved nutritive skin microcirculatory reactivity [16]. In addition, in patients with type 2  
47  
48 diabetes treated with regular insulin, metformin as compared to a placebo improved plasma markers of  
49  
50 endothelial function independently from changes in glycemic control [17]. Furthermore, the pleiotropic  
51  
52 vascular effects of metformin are known to be independent from its antihyperglycemic effects [18, 19].  
53  
54  
55  
56 Fast-acting insulin analogs have a more rapid onset than regular insulin and can better reduce  
57  
58 postprandial glycemic excursions. These new formulations are more efficacious for the treatment of  
59  
60 acute hyperglycemia, inhibit the production of free radicals and counteract oxidative stress [20-22].  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64

These molecules, compared to regular insulin, can also restore post-prandial microvascular blood flow in patients with type 1 diabetes [23]. However, the short term effects on CBF after the initiation of insulin analog treatment as an add-on to metformin in the post-prandial period is not known in type 2 diabetic patients, although widely used.

The aim of this study was to examine the changes in CBF and microcirculatory endothelial function in poorly controlled type 2 diabetic patients at fasting and after a standardized breakfast, with three different insulin regimens. We hypothesized that insulin treatment with long-acting, fast-acting or basal bolus insulin as an add-on to metformin would provide additional improvement of CBF either at fasting, after a meal, or both.

## Research design and methods

### Patients

The INSULin Regimens and VASCular Functions (INSUVASC) study was a pilot, randomized, open label three-arm study that was conducted at Jean Verdier University Hospital (Bondy, France). The study was approved both by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes), by the French National Agency for Drug Security (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) and was registered as a clinical trial (NCT01022658).

The inclusion criteria were the following: patients with healthcare insurance and type 2 diabetes for at least 1 year, age between 30 years and 72 years, BMI ranging from 20 to 37 kg/m<sup>2</sup>, HbA1c from 7.1 to 12% (53–108 mmol/mol) under the maximal tolerated dose of sulfonylureas and metformin use during the last 2 months. If hypertension (defined as blood pressure  $\geq$ 140/90 mmHg or current anti-hypertensive treatment) or dyslipidemia (defined as serum total cholesterol  $>$ 6.5 mmol/l, or triglycerides  $>$ 2.3 mmol/l, or current lipid-lowering treatment) was present, the participant should have had no changes in their treatment during the last 3 months. Exclusion criteria were the following: pregnancy or absence of contraception in women of childbearing age, anemia (hemoglobin level  $<$ 10 g/dl), proliferative or severe non-proliferative retinopathy requiring laser treatment, uncontrolled hypertension (systolic and/or diastolic blood pressure  $\geq$ 160/100 mmHg), inability to check capillary blood glucose

1 and to adjust insulin treatment, moderate to severe renal failure (glomerular filtration rate <40  
2 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, calculated with the MDRD equation), hepatic failure (prothrombin time <70%), chronic  
3 respiratory disease, cardiac arrhythmia, and lower limb arterial disease (intermittent claudication,  
4 absence of lower limb peripheral pulses or ankle brachial pressure index <0.9). Patients should not have  
5 been treated with corticosteroids, thiazolidinediones, alpha glucosidase, di-peptidyl-peptidase 4  
6 inhibitors or glucagon like peptide 1 analog treatment during the last 2 months and no insulin allergy.  
7  
8 Diabetic retinopathy was defined according to the Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study  
9 severity scale. Nephropathy was defined as a 24-h urinary albumin excretion rate  $\geq 30$  mg/day in at least  
10 two assessments. The diagnosis of peripheral neuropathy was based on the presence of any two or more  
11 of the following: neuropathic symptoms, decreased distal sensation or decreased or absent ankle  
12 reflexes. Smoking was defined as present if patient continued to smoke or had stopped for less than 3  
13 years ago.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

### 29 Study design

30 Participants had during the 2-month pre-inclusion period reinforced adherence to treatment and dietary  
31 advice and were treated with the maximal tolerated dose of sulfonylureas and metformin. All subjects  
32 were on metformin (2g/day) and the maximal dose of sulfonylurea was for gliclazide 120mg/day and for  
33 glimepiride 6mg/day. Patients provided written informed consent and had a first visit (V1). Sulfonylurea  
34 treatment was given 24 hours before V1 and was stopped afterwards for the duration of the study.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

44 Patients took only metformin during V1 (Figure 1).

45  
46 After V1, patients were randomized to a 4-to-5-week treatment with one of three different insulin  
47 regimens (Aspart, Detemir, or Aspart combined with Detemir). Aspart was to be injected 15 min before  
48 each meal and Detemir once per day at 22:00 h. Participants were contacted for follow-up by telephone,  
49 and insulin treatment was adjusted to twice a week by two physicians (MF and KT) according to 6 daily  
50 glycemic measurements with the use of a prespecified protocol (Additional Table 1). There were no  
51 modifications for metformin, antihypertensive or lipid lowering treatment during the study. After 4-5  
52 weeks, participants had their second visit (V2), which followed the same study protocol as V1.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

At V1, all participants arrived at 07:30 in the morning after an overnight fast and were instructed to abstain from smoking, drinking alcohol-containing drinks, ingestion of coffee or tea during the morning prior to the study and to void their bladder. Measurements were conducted at an ambient temperature of 22 to 24°C, 30 min after the insertion of a catheter for drawing blood in the right arm, in a room where noise and light were kept to a minimum. Patients remained in the supine position throughout the test. Fasting capillary glycemia was measured and laser Doppler measurements (Periflux System 5000®; Perimed, Stockholm, Sweden) were performed only if the glucose value was between 60 and 250 mg/dl at fasting (H0). Blood samples were collected at fasting.

Next, the patients ate a standardized breakfast consisting of 60 g bread, 30 g jam, 200 ml orange juice, and 100 ml coffee or tea (providing a total of 75 g of carbohydrates). After having their breakfast, participants took their usual metformin treatment. Laser Doppler measurements were repeated 1 and 2 h (H1 and H2) after breakfast. Blood samples were collected just after CBF measurements (H1 and H2). During the second visit (V2), we used the same protocol, with metformin and Aspart injection 15 min before breakfast.

#### 34 Laser Doppler measurements

39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

The laser Doppler device had a 32 Hz sampling frequency, 780 nm wavelength, from 10 Hz to 19 kHz bandwidth, and a 0.1 s time constant. The laser Doppler signal processing was performed with Perisoft software (version 2.5.5). Laser Doppler measurements were recorded from the median aspect of the lower forearm in the supine position. Blood flow was measured in arbitrary units (perfusion units). For calibration, the laser probe was held in a probe holder against a uniform white surface.

51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

CBF was measured during each test period (H0, H1, and H2) as follows: 6 min at rest with spontaneous breathing, then 1 min recording with paced deep breathing at a frequency of 6 breaths/min. After 1 min at rest, cutaneous administration of acetylcholine (ACh) was performed by 0.2 mAmp iontophoretic pulses lasting 25 s. CBF was measured at least 6 min after ACh administration. ACh (Miochole®,

Novartis) was applied via a gel sponge soaked with 0.2 ml of 2% Ach in the self-contained chamber of the laser Doppler probe.

### Analyses of changes in CBF

CBF decreases when inhaling due to sympathetic nervous system activation. The percent of decrease from the zenith to the nadir of the signal wavelet was calculated, and the mean decrease during the three last breaths was used as an index of microvascular sympathetic activity [24]. The measurements calculated after Ach administration were the following: (i) maximal CBF after Ach administration (maximal CBF), (ii) CBF area under the curve (AUC) 3 min from the beginning of Ach administration, which is considered an integrator of microvascular endothelial function [25], (iii) delay from the beginning of Ach administration to the maximal CBF (peak delay), (iv) peak tangent from basal to maximal CBF (tangent increase represents the acceleration in tissue perfusion), and (v) vasodilation duration, corresponding to the beginning of Ach administration to the return to 20% increase from basal CBF (Additional Figure 1).

### Biochemistry

Glucose level was measured in the venous plasma by colorimetry with the glucose oxidase method (Kone Optima, Thermolab System, France). HbA1c measurement was based on the turbidimetric inhibition immunoassay principle (Dimension® technology, Siemens Healthcare Diagnosis Inc., Newark, NJ, USA). The HbA1c level was standardized according to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Fructosamine was measured by the nitroblue tetrazolium colorimetric procedure (COBAS; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany).

Total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, and triglycerides were measured with enzymatic colorimetry (Hitachi 912, Roche Diagnostic, France). Low density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated using the Friedwald formula; no patients had triglyceride concentrations

greater than 400 mg/dl. The urinary albumin excretion rate was measured with laser immunonephelometry (BN100; Dade-Behring), and free fatty acids were measured with enzymatic colorimetry (Wako Chemicals, GmBH).

Serum samples were centrifuged at  $-4^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . These samples were used for an enzyme-linked immunosorbent assay to measure nitrotyrosine (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), oxidated LDL (Uscn, Wuhan, China), E-selectin (R&D Systems, Abingdon, UK), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions.

### Sample size and statistical analyses

INSUVASC was a pilot study, and the number of patients necessary was calculated. The anticipated effect size ( $\Delta/\sigma$ ) for our study was estimated at 1.1, the power level was 80% and the probability level was set at 0.05 for the 3 groups. The estimated minimum sample size for a two-tailed hypothesis was calculated at 14 persons per group.

According to the protocol, statistical analyses were performed with SAS version 9.2. Variables were expressed as mean  $\pm$  SD or as percentages. We used a normalizing transformation for variables that were not normally distributed. When the variances were not homogeneous even after transformation, we performed non-parametric tests with one-way analysis of variance (ANOVA) by ranks using the Kruskal-Wallis test. Quantitative variables were analyzed by repeated measures ANOVA. The chi-square test was used for comparisons of categorical variables. Repeated measures ANOVA was conducted between V1 and V2 to describe the time effect (i.e., the insulin treatment effect). ANOVA was designed for a 2 factor (V1 and V2) and 3 level (H0, H1, and H2) analysis. A two-way interaction (treatment group by time) was tested for the insulin treatment group effect (Aspart, Detemir or their combination). The 3 treatment groups were compared with *post-hoc* analyses for each level with Bonferroni correction in order to further understand the level of interaction. Missing values were randomly distributed and did not affect the data in a systematic way.

## Results

### Patients' characteristics (Table 1)

A total of 42 patients were included. One patient was excluded for a deviation from the study protocol, a second patient withdrew his consent and for 6 patients, we were obliged to stop the test.

At the end of the study, 34 patients (Aspart,  $n = 8$ ; Detemir,  $n = 13$ ; Aspart combined with Detemir,  $n = 13$ ) had good quality recordings of laser Doppler measurements at all 6 periods (H0, H1, and H2 for V1 and V2). Only the data for these 34 patients is presented. At baseline, the three treatment groups did not present any statistically significant differences in age, BMI, gender or diabetes duration.

### Effect of insulin treatment on metabolic parameters (Table 2)

At V1, the mean HbA1c for all patients was  $75 \pm 16$  mmol/mmol ( $9.0 \pm 1.4$  %), which decreased to  $67 \pm 14$  mmol/mmol at V2 ( $8.3 \pm 1.3$  %,  $P < 0.001$ ). There was also a decrease in fructosamine (Table 2) after insulin treatment, and the effect was more pronounced in patients treated by Aspart alone or in combination with Detemir ( $P$  for interaction = 0.0004 for HbA1c and  $P = 0.014$  for fructosamine).

Plasma glucose also decreased between V1 and V2, at fasting and 1 and 2 h after breakfast ( $P < 0.001$  for all), as expected with no difference in effect among the treatment groups. There was a significant 20.7% mean decrease in C peptide levels 2 h post-prandially in the Detemir group, 11.9% in the Aspart group and 44% in the Aspart/Detemir group ( $P$  for interaction = 0.0266). Post-prandial levels of HDL cholesterol (H1 and H2) increased and triglycerides (H0, H1, and H2) decreased between V1 and V2 without a significant treatment effect. Total LDL cholesterol and microalbuminuria were not modified by any of the treatments.

Free fatty acids decreased at fasting in patients treated by Detemir or Aspart and Detemir ( $P$  for interaction = 0.0127) as well as during the post-prandial period in patients treated by Aspart or Aspart and Detemir ( $P$  for interaction = 0.0119).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Biochemical markers of oxidative stress and endothelial function**

After insulin treatment, oxidative stress marker (nitrotyrosine and oxidated LDL) levels did not change at fasting or during the post-prandial period. Insulin treatment significantly reduced the levels of endothelial markers of dysfunction including VCAM-1 at fasting ( $P = 0.0467$ ) and post-prandially ( $P = 0.0393$ ) and E-selectin at fasting ( $P = 0.0367$ ) and post-prandially ( $P = 0.050$ ), with no difference between the insulin treatment groups (Additional file table 2).

**CBF in all patients before randomization**

During V1, patients took only metformin. Compared to fasting (H0), CBF increased at H1 and H2 after breakfast (+36.9% and +45.6%, respectively,  $P < 0.001$  for both), and the CBF decrease during deep inhaling was larger at H1 and H2 ( $P = 0.024$ ). After breakfast, following Ach stimulation, the maximal CBF, peak delay, AUC, and vasodilation duration were higher than at fasting (Table 3).

**CBF in all patients before and after insulin treatment**

There were no differences between V1 and V2 regarding CBF at rest and during deep breathing. At fasting after Ach iontophoresis, the insulin treatment effect was significant for the AUC increase and for the maximal value of CBF (V1 vs V2 at H0,  $P = 0.039$  and  $P = 0.019$ , respectively), indicating improved endothelial reactivity at fasting (Figure 2). During postprandial period, only maximal CBF increased 1 hour after breakfast. All other parameters were similar.

**Effect of insulin treatment on CBF after 4 weeks during fasting and the post-prandial period**

Figure 3 shows the effect of each treatment group on CBF during the fasting period (H0) and the post-prandial period 1 and 2 h after a standardized breakfast. The results were similar among all insulin treatment groups for CBF at rest and after Ach stimulation (Additional Tables 3, 4, and 5).

### Correlations between changes in CBF and metabolic parameters

We tested the individual changes ( $\Delta$ ) at V1 from the fasting period to the 2 h post-prandial period for CBF and examined their correlation with changes in metabolic parameters. The  $\Delta$ glycemia ( $\beta = 0.415$ ,  $P = 0.020$ ) and the  $\Delta$  free fatty acids (FFAs) ( $\beta = -0.428$ ,  $P = 0.023$ ) were statistically significant.  $\Delta$ TG,  $\Delta$ LDL and  $\Delta$ glucagon did not correlate with  $\Delta$ CBF. After 4 weeks of insulin treatment (V2), the association between  $\Delta$ CBF and changes in metabolic parameters was not significant.

### Discussion

The INSUVASC study demonstrated that in type 2 diabetic patients inadequately controlled with metformin and sulfonylurea, the insulin analogs Aspart, Detemir or their combination as add-ons to metformin after a 4-week treatment improved microvascular endothelial reactivity at fasting, without differences among insulin regimens. In addition, insulin analog treatments had no effect on basal CBF either at fasting or post-prandially.

After insulin treatment, there was an improvement of fasting and post-prandial glycemia, HbA1c and fructosamine, as expected. The treatment effect was more pronounced for HbA1c and fructosamine in the rapid insulin analog group (Aspart alone or combined with Detemir). Although, a time effect on glycemic control is expected usually in a period superior than 4 to 5 weeks of treatment, our results have confirmed, in a shorter observation period, previous studies that achieved lower HbA1c with rapid acting insulin analogs. There was a decrease in triglycerides with HDL improvement at fasting and during the post-prandial period. C peptide decreased at fasting and 2 h post-prandially, and the effect of Aspart and Detemir combined was more efficacious. FFAs decreased at fasting in patients treated by Detemir and post-prandially in those treated by Aspart. All these metabolic changes have been previously reported [26, 27] and may have played a role in the improvement of endothelial function [28].

Oxidative stress is considered to be the major mechanism for the impairment of vascular function subsequent to hyperglycemia [29]. It has been shown that the administration of antioxidants can attenuate this phenomenon in healthy subjects [30, 31] and in diabetic patients [32, 33], although some studies have implied that antioxidant supplementation may even be harmful [34]. In the present study there was no significant decrease in nitrotyrosine or oxidated LDL levels.

Indeed, metformin, at the molecular level, is not a very efficient scavenger for reactive oxygen species [35], but can increase antioxidant enzyme activities, as shown in animal models [36], and can decrease markers of lipid peroxidation [37]. The effect of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve has been shown in metformin treated patients with newly diagnosed diabetes [38]. The absence of further decrease in the levels of oxidative stress markers after insulin treatment suggested that insulin analogs did not improve the antioxidant effect of metformin.

Additional reduction of oxidative stress could be due to the rapidity of insulin analog action [39] and the presence of antioxidants in the orange juice that was part of the standardized breakfast [40, 41].

Our patients were tested while taking only metformin during the first visit, and despite poor glycemic control at fasting and a marked elevation of glycemic levels after breakfast, they exhibited an increase in CBF, an improvement of Ach-stimulated endothelial function and a reduction of CBF during sympathetic activation induced by deep breathing during the post-prandial period. The increase in microvascular vasomotion after meal ingestion has been reported to be ablated in obese individuals, due to various factors including FFAs, adipokines, or renin angiotensin system hyperactivity [42]. In our study, vasoreactivity improved after the standard breakfast, probably as a result of an increase in endogenous insulin, as depicted by the marked elevation of C peptide levels, a molecule that also has a biological action in microcirculation [43]. Thus, despite poor glycemic control in patients with long-standing diabetes, metformin might play an additional role in the preservation of the post-prandial vasomotion. Further studies specifically designed for the microvascular action of metformin are needed to elucidate its role.

After insulin treatment, basal CBF was not modified either at fasting or post-prandially, and CBF response to sympathetic activation remained unchanged. Insulin-induced changes in skin

microcirculatory flow have been shown to be independent from hypoglycemic action in type 1 diabetes [44]. Our findings suggest the presence of the same effect in type 2 diabetes, since after 4 weeks of insulin treatment, the association between  $\Delta$ CBF and the change in metabolic parameters was no longer statistically significant. Our data suggests that local regulation during the post prandial period does not depend on the substrate, because insulin treatment and subsequent glucose decrease did not modify either the magnitude or the pattern of post-prandial CBF increase.

The kinetics of insulin analogs seem to be responsible for the regulation of post-prandial microvascular skin blood flow, as shown with ultra-rapid-acting insulin, which provided an increase in skin microvascular blood flow comparable to that observed in non-diabetic controls [22]. However, most studies have examined the immediate effect of the first injection of rapid analogs on CBF, and to our knowledge, there has been no prospective study on its effects after a short-term treatment with a standardized meal in patients with type 2 diabetes [21, 22]. Similar effects have been observed in other tissues like the myocardium, where perfusion defects improved post-prandially in patients treated with rapid action analogs but not in the group treated with regular insulin [45].

At fasting, insulin treatment increased the Ach-stimulated response and the maximal blood flow, which indicates an improved endothelial response, while this effect was practically not seen in the postprandial period. After insulin treatment, the lack of improvement in endothelial function during the post-prandial period might be due to protection by metformin, a phenomenon that was detected before insulin treatment. Ach mediates vasodilation via the endothelial-dependent production of nitric oxide and/or prostanooids, with a possible accessory role played by the endothelial-derived hyperpolarizing factor [46]. The presence of microvascular dysfunction is also known to be non endothelium dependent and can be attributed to structural changes induced by diabetes [47]. We cannot exclude the presence of a non-endothelial process like structural defects. The presence of structural microvascular lesions can modify the amplitude of the Ach response and induce a significant bias. These defects can be detected by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, but sodium nitroprusside stimulation was not part of our protocol. The study participants did not have a history of macrovascular disease, and there were no differences among the three treatment groups for the prevalence of retinopathy, nephropathy or



neuropathy after randomization. We consider that the balanced distribution of clinical microvascular disease among the three groups and the similar diabetes duration attenuated this potential source of bias. We also observed a decrease of endothelial activation markers, E selectin, and VCAM-1, at fasting and post-prandially after insulin treatment. This beneficial effect of insulin treatment on endothelial biomarkers was previously published by our group [48] and has been also described for long-acting insulin analogs [49]. The similar response in the three treatment groups suggests that this effect is not related to the rapid action of insulin but to the hormone itself, providing an additional decrease in endothelial activation when combined with metformin.

However, this study did have some weaknesses. Although metabolic parameters were improved, the relatively short time of the study did not allow us to achieve maximal glycemic control. The study design was open labeled to make possible insulin dose adjustments, while the changes in non-endothelial processes were not tested using sodium nitroprusside. Another weak point was the absence of a control group without insulin treatment since our primary objective was to evaluate the action of the 3 insulin regimens. CBF recordings were less than expected leading to a loss of statistical power.

One strength of our study was that the presence of run in period of 2 months in order to confirm the failure to treatment with oral antidiabetic agents. Insulin treatment was allocated in a randomized manner, eliminating any bias in treatment assignment. The additional effect of this treatment could be assessed with a meal where only metformin was given as a control. In addition, the presence of three treatment groups provided the opportunity to study the effect of both long- and rapid-acting analogs.

In conclusion, before randomization, in patients with long-standing type 2 diabetes, poor glycemic control, and low prevalence of microangiopathic complications, we observed that basal CBF increased, vasoreactivity improved, and markers of endothelial dysfunction decreased after a standardized breakfast while patients took only metformin. Our findings could suggest a protective role for metformin against oxidative stress and meal-induced vascular changes, but our study was not designed to test this hypothesis. Insulin analog treatment as an add-on to metformin did not significantly increase basal CBF, but improved endothelial function at fasting without significant post-prandial effects of insulin treatment, possibly due to background protection by metformin. The improvement of endothelial

1 markers occurred after insulin treatment, both at fasting and post-prandially. Endothelial function,  
2 despite better metabolic control, was partially improved, with no differences according to the insulin  
3 regimen.

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10 **Trial registration:** The INSULin Regimens and VASCular Functions (INSUVASC) study was  
11 registered as a clinical trial (NCT01022658).

## 12 13 14 15 16 17 18 **Declarations**

19  
20  
21 **Ethics approval and consent to participate:** The study was approved both by the local ethics  
22 committee (Comité de Protection des Personnes), by the French National Agency for Drug Security  
23 (Agence Nationale de Sécurité du Médicament)

24  
25  
26  
27  
28  
29 **Availability of data and material:** Data sharing not applicable. Data are owned by the French National  
30 health system (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). Paul Valensi is the guarantor of this work and,  
31 as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data  
32 and the accuracy of the data analysis.

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41 **Competing interests:** All authors declare that there are no potential conflicts of interest.

42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50 **Funding:** This work was supported by a grant from the Novo-Nordisk foundation and was promoted by  
51 the French national health system (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). There was no additional  
52 funding for writing and publishing the manuscript.

## 53 54 **Authors' contributions:**

55  
56  
57 **Marinos Fysekidis:** wrote the manuscript, recruited patients, performed the tests during V1 and V2 and  
58 analyzed data.

1  
2  
3 **Emmanuel Cosson**: designed the study, directed research, recruited patients, contributed to discussion  
4 and reviewed/edited the manuscript.

5  
6  
7  
8 **Karim Takhou**: recruited patients, performed the tests during V1 and V2 , collected data and  
9 participated in the design of the study.

10  
11  
12 **Angela Sutton**: performed biochemistry laboratory measurements and contributed to discussion.

13  
14  
15 **Nathalie Charnaux** : performed biochemistry laboratory measurements and contributed to discussion

16  
17  
18 **Isabella Banu**: recruited patients, participated in the design of the study and contributed to discussion.

19  
20  
21 **Eric Vicaut**: participated in the design of the study and performed statistical analyses.

22  
23  
24  
25 **Paul Valensi**: Designed the study, recruited patients, directed research, contributed to discussion and  
26 reviewed/edited the manuscript.

## 27 28 29 **Acknowledgements**

30  
31  
32  
33  
34  
35 This work was supported by a grant from the Novo-Nordisk foundation and was promoted by Assistance  
36 Publique-Hôpitaux de Paris.

## References

- 1] Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol* (1985) 2008;105(1):370-2.
- 2] Rossi M, Carpi A, Galetta F, Franzoni F, Santoro G. The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? *Biomed Pharmacother* 2006;60(8):437-42.
- 3] Khan F, Patterson D, Belch JJ, Hirata K, Lang CC. Relationship between peripheral and coronary function using laser Doppler imaging and transthoracic echocardiography. *Clin Sci (Lond)* 2008;115(9):295-300. doi: 10.1042/CS20070431.
- 4] Rossi M, Maurizio S, Carpi A. Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects. *Microvasc Res* 2005;70(1-2):17-22.
- 5] Seme EH, RG JJ, Gans RO, Nijveldt R, De Vries G, Evertz R, et al. Direct evidence for insulin-induced capillary recruitment in skin of healthy subjects during physiological hyperinsulinemia. *Diabetes* 2002;51(5):1515-22.
- 6] Jonk AM, Houben AJ, Schaper NC, de Leeuw PW, Seme EH, Smulders YM, et al. Obesity is associated with impaired endothelial function in the postprandial state. *Microvasc Res* 2011;82(3):423-9.
- 7] Jaap AJ, Shore AC, Tooke JE. Relationship of insulin resistance to microvascular dysfunction in subjects with fasting hyperglycaemia. *Diabetologia* 1997;40(2):238-43.
- 8] Wiernsperger N. Defects in microvascular haemodynamics during prediabetes: contributor or epiphenomenon? *Diabetologia* 2000;43(11):1439-48.
- 9] Jonk AM, Houben AJ, Schaper NC, de Leeuw PW, Seme EH, Smulders YM, et al. Meal-related increases in microvascular vasomotion are impaired in obese individuals: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Diabetes Care* 2011;34 Suppl 2:S342-8.
- 10] Czernichow S, Greenfield JR, Galan P, Bastard JP, Chamaux N, Samaras K, et al. Microvascular dysfunction in healthy insulin-sensitive overweight individuals. *J Hypertens* 2010;28(2):325-32.
- 14] Rossi M, Nannipieri M, Anselmino M, Pesce M, Muscelli E, Santoro G, et al. Skin vasodilator function and vasomotion in patients with morbid obesity: effects of gastric bypass surgery. *Obesity surgery* 2011;21(1):87-94.
- 15] Aviles-Santa L, Sinding J, Raskin P. Effects of metformin in patients with poorly controlled, insulin-treated type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine* 1999;131(3):182-8.
- 13] Wulffele MG, Kooy A, Lehert P, Bets D, Ogterop JC, Borger van der Burg B, et al. Combination of insulin and metformin in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(12):2133-40.
- 14] Giugliano D, Quattraro A, Consoli G, Minei A, Ceriello A, De Rosa N, et al. Metformin for obese, insulin-treated diabetic patients: improvement in glycaemic control and reduction of metabolic risk factors. *European journal of clinical pharmacology* 1993;44(2):107-12.
- 15] Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012;35(6):1364-79.
- 18] Kraemer de Aguiar LG, Laflor CM, Bahia L, Villela NR, Wiernsperger N, Bottino DA, et al. Metformin improves skin capillary reactivity in normoglycaemic subjects with the metabolic syndrome. *Diabet Med* 2007;24(3):272-9.
- 17] De Jager J, Kooy A, Lehert P, Bets D, Wulffele MG, Teerlink T, et al. Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med* 2005;257(1):100-9.
- 13] Valensi P, Behar A, Andre P, Wiernsperger N, Artali JR. The effects of metformin on the capillary permeability to albumin in women patients with cyclic edema. *Angiology* 1995;46(5):401-8.
- 19] Wiernsperger NF. Metformin: intrinsic vasculoprotective properties. *Diabetes Technol Ther* 2000;2(2):259-72.

- [20] Gale EA. A randomized, controlled trial comparing insulin lispro with human soluble insulin in patients with Type 1 diabetes on intensified insulin therapy. The UK Trial Group. *Diabet Med* 2000;17(3):209-14.
- [21] Hohberg C, Forst T, Larbig M, Safinowski M, Diessel S, Hehenwarter S, et al. Effect of insulin glulisine on microvascular blood flow and endothelial function in the postprandial state. *Diabetes Care* 2008;31(5):1021-5.
- [22] Forst T, Pflutzner A, Flacke F, Krasner A, Hohberg C, Tarakci E, et al. Postprandial vascular effects of VIAject compared with insulin lispro and regular human insulin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33(1):116-20.
- [23] Forst T, Forst S, Strunk K, Lobig M, Welter K, Kazda C, et al. Impact of insulin on microvascular blood flow and endothelial cell function in the postprandial state in patients with Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2005;19(3):128-32.
- [24] Valensi P, Smagghe O, Paries J, Velayoudon P, Nguyen TN, Attali JR. Peripheral vasoconstrictor responses to sympathetic activation in diabetic patients: relationship with rheological disorders. *Metabolism* 1997;46(3):235-41.
- [25] Andreassen AK, Gullestad L, Holm T, Simonsen S, Kvernebo K. Endothelium-dependent vasodilation of the skin microcirculation in heart transplant recipients. *Clinical transplantation* 1998;12(4):324-32.
- [26] Aslan I, Kucuksayan E, Aslan M. Effect of insulin analog initiation therapy on LDL/HDL subfraction profile and HDL associated enzymes in type 2 diabetic patients. *Lipids in health and disease* 2013;12:54.
- [27] Ceriello A, Del Prato S, Bue-Valleskey J, Beattie S, Gates J, de la Pena A, et al. Premeal insulin lispro plus bedtime NPH or twice-daily NPH in patients with type 2 diabetes: acute postprandial and chronic effects on glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Diabetes Complications* 2007;21(1):20-7.
- [28] Ceriello A, Taboga C, Tomutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002;106(10):1211-8.
- [29] Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001;44(7):834-8.
- [30] De Marchi S, Prior M, Rigoni A, Zecchetto S, Rulfo F, Arosio E. Ascorbic acid prevents vascular dysfunction induced by oral glucose load in healthy subjects. *European journal of internal medicine* 2012;23(1):54-7.
- [31] Morand C, Dubray C, Milenkovic D, Lio ger D, Franc J, Scalbert A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice : a randomized crossover study in healthy volunteers 1 – 3. 2011(7):73-80.
- [32] 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;14(1):68-72.
- [33] Reaven PD, Herold DA, Barnett J, Edelman S. Effects of Vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM. *Diabetes Care* 1995;18(6):807-16.
- [34] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C. Antioxidant supplements and mortality. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2014;17(1):40-4.
- [35] Khouri H, Collin F, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Jore D, Gardes-Albert M. Radical-induced oxidation of metformin. *European journal of biochemistry / FEBS* 2004;271(23-24):4745-52.
- [36] Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 2006;55(2):496-505.
- [37] Tessier D, Maheux P, Khalil A, Fulop T. Effects of gliclazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes. *Metabolism* 1999;48(7):897-903.
- [38] Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, Noshad S, Mousavizadeh M, Hedayati M, et al. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2013;32(2):179-85.

- [39] Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* 2002;25(8):1439-43.
- [40] Sanchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granada F, et al. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3):454-60.
- [41] Buscemi S, Rosafio G, Arcoleo G, Mattina A, Canino B, Montana M, et al. Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2012;95(5):1089-95.
- [42] Jonk AM, Houben AJ, Schaper NC, de Leeuw PW, Serne EH, Smulders YM, et al. Meal-related increases in microvascular vasomotion are impaired in obese individuals: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Diabetes Care* 2011;34 Suppl 2:S342-8.
- [43] Wahren J, Kallas A, Sims AA. The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes* 2012;61(4): 761-72.
- [44] Tooke JE, Lins PE, Ostergren J, Adamson U, Fagrell B. The effects of intravenous insulin infusion on skin microcirculatory flow in Type 1 diabetes. *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation* 1985;4(1):69-83.
- [45] Scognamiglio R, Negut C, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Avogaro A. Effects of different insulin regimes on postprandial myocardial perfusion defects in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2006;29(1):95-100.
- [46] Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends in cardiovascular medicine* 2008;18(4):109-16.
- [47] Katz a, Ekberg K, Johansson BL, Wahren J. Diminished skin blood flow in Type I diabetes: evidence for non-endothelium-dependent dysfunction. *Clinical science (London, England : 1979)* 2001;101(1):59-64.
- [48] Albertini JP, Valensi P, Lormeau B, Aourousseau MH, Ferriere F, Attali JR, et al. Elevated concentrations of soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM. Effect of intensive insulin treatment. *Diabetes Care* 1998;21(6):1008-13.
- [49] Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Mariano V, Boscaro E, Bertolini F, Mancuso P, et al. Optimized glycaemic control achieved with add-on basal insulin therapy improves indexes of endothelial damage and regeneration in type 2 diabetic patients with macroangiopathy: a randomized crossover trial comparing detemir versus glargine. *Diabetes Obes Metab* 2011;13(8):718-25.

## Legends

Table 1: Patient characteristics at the inclusion

Table 2: Metabolic parameters during the first visit 1 (V1), second visit (V2), and after a 4-week insulin treatment

Table 3: Fasting and post-prandial cutaneous blood flow before randomization

Figure 1: INUVASC study protocol

1  
2 **Figure 2:** A) CBF at rest; B) decrease in CBF during deep breathing; C) maximal CBF after  
3 acetylcholine stimulation (V1 vs V2, at fasting (H0),  $P = 0.039$ ); D) area under the curve after  
4 acetylcholine stimulation (V1 vs V2, at fasting (H0),  $P = 0.019$ ); E) peak delay after acetylcholine  
5 stimulation and peak tangent after acetylcholine stimulation; and G) vasodilation duration after  
6 acetylcholine stimulation at visit 1 before (V1, black circles, ●) and after (V2, black squares, ■) insulin  
7 treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SE. AUC, area under the curve; CBF, cutaneous blood flow;  
8 PU, perfusion units  
9  
10  
11 **Figure 3:** Cutaneous blood flow for each treatment group (Detemir, Aspart, and Detemir with Aspart),  
12 before (visit 1, V1 black circles, ●) and 4 weeks after insulin treatment (at visit 2, V2, black squares, ■)  
13 at fasting (H0), and post-prandially (H1 and H2).  
14 A) CBF at rest; B) % decrease in CBF during deep breathing; C) maximal CBF after acetylcholine  
15 stimulation; D) area under the curve after acetylcholine stimulation; E) peak delay after acetylcholine  
16 stimulation; F) peak tangent after acetylcholine stimulation, and G) vasodilation duration after  
17 acetylcholine stimulation.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

Figure 1

Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

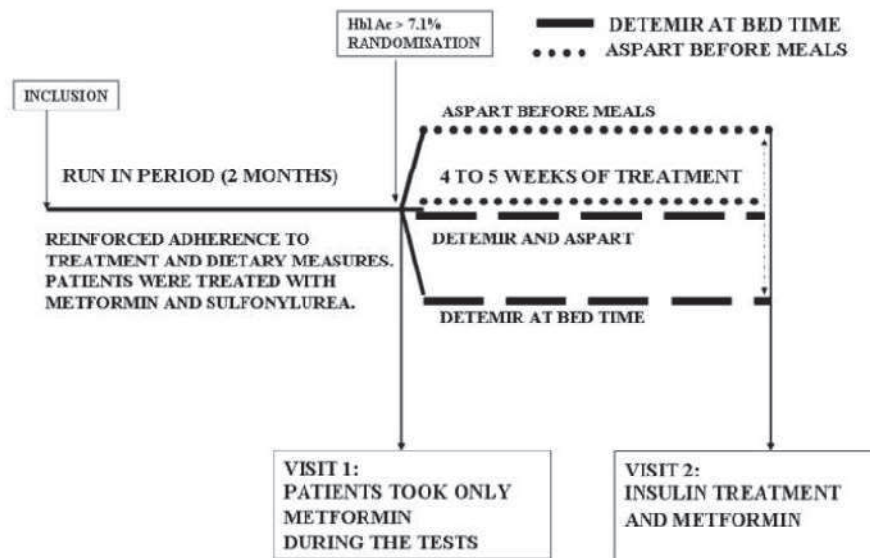


Figure 2

Figure  
[Click here to download high resolution image](#)

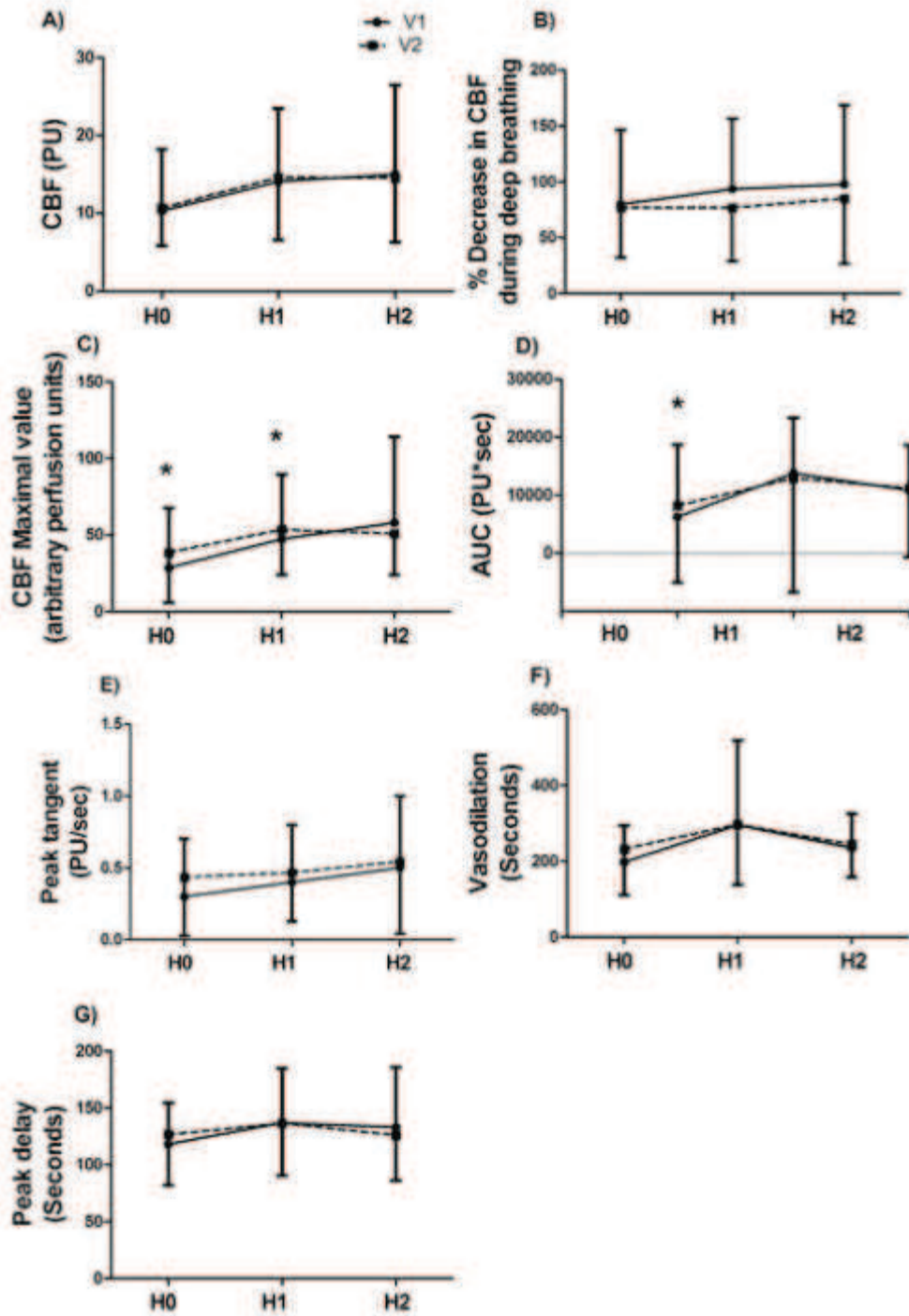


Figure 3



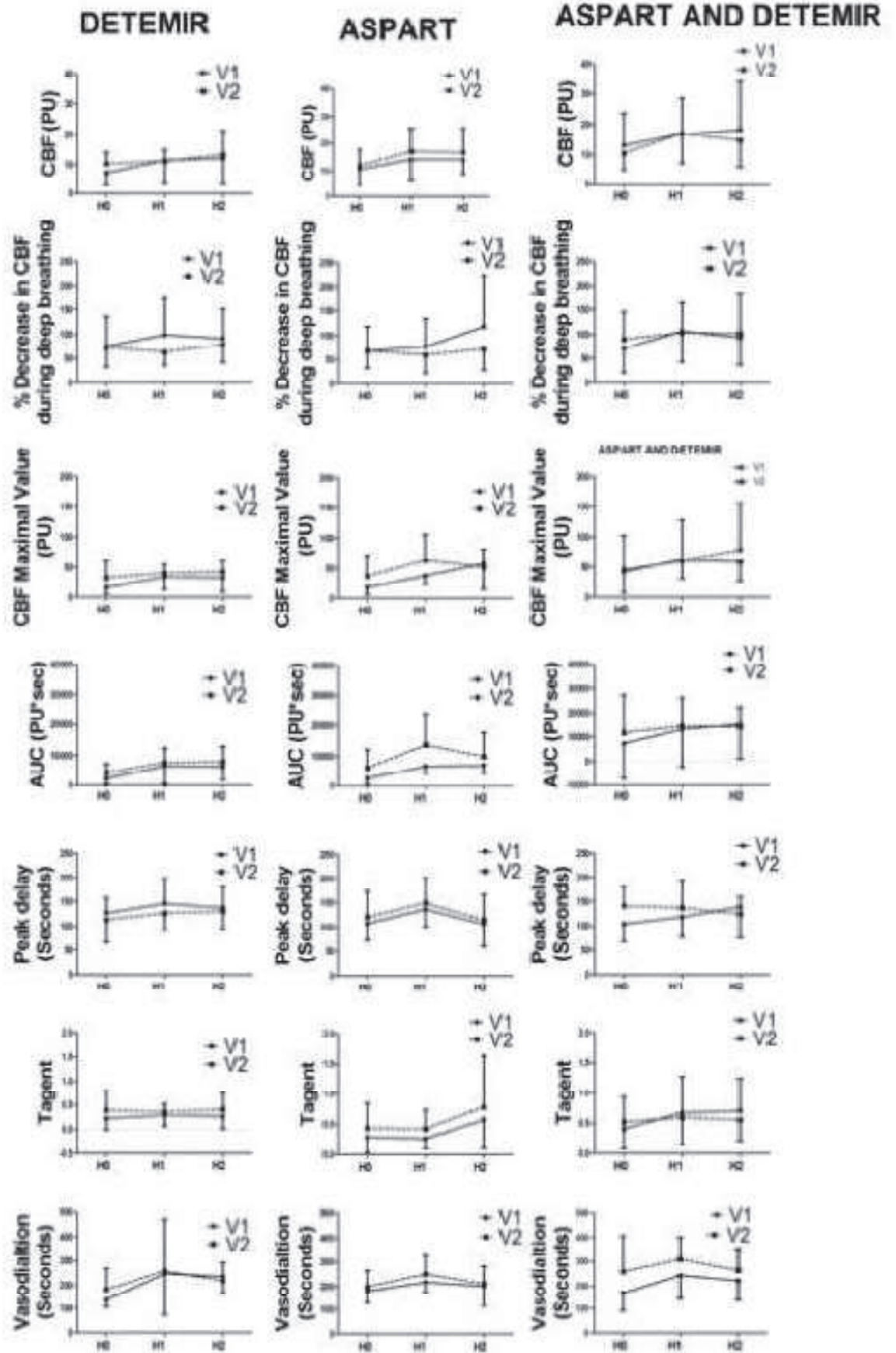


Table 1

	Total (n=34)	Detemir (n=13)	Aspart (n=8)	Detemir and Aspart (n=13)
Age(years)	52.9 ± 9.9	54.2 ± 10.2	53.5 ± 9.0	51.2 ± 10.6
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	29.4 ± 4.7	29.7 ± 4.8	30.4 ± 5.3	28.6 ± 4.5
Gender, Male/Female (%)	15/19 (44/56)	9/4 (69/31)	2/6 (25/75)	4/9 (31/69)
Diabetes duration (years)	10.3 ± 5.3	12.1 ± 5.6	9.3 ± 3.6	9.2 ± 5.9
Retinopathy (%)	3 (8.8%)	1 (7.7%)	2 (25.0%)	0 (0.0%)
Nephropathy (%)	6 (17.6%)	3 (23.1%)	1 (12.5%)	2 (15.4%)
Neuropathy (%)	4 (11.8%)	2 (15.4%)	2 (25.0%)	0 (0.0%)
Hypertension (%)	15 (44.1%)	7 (53.8%)	3 (37.5%)	5 (38.5%)
Dyslipidemia (%)	13 (38.2%)	6 (46.2%)	3 (37.5%)	4 (30.8%)
Smokers (%)	3 (8.8%)	1 (7.7%)	1 (12.5%)	1 (7.7%)
Treatment				
Metformin (%)	34 (100.0%)	13 (100.0%)	8 (100.0%)	13 (100.0%)
Sulfonylurea (%)	34 (100.0%)	13 (100.0%)	8 (100.0%)	13 (100.0%)
Statins (%)	12 (35.3%)	6 (46.2%)	2 (25.0%)	4 (30.8%)
Fibrates (%)	2 (5.9%)	0 (0.0%)	1 (12.5%)	1 (7.7%)

Platelet antiaggregants (%)	8 (23.5%)	4 (30.8%)	1 (12.5%)	3 (23.1%)
ACE-inhibitors (%)	6 (17.6%)	2 (15.4%)	2 (25.0%)	2 (15.4%)
ARBs (%)	7 (20.6%)	4 (30.8%)	0 (0.0%)	3 (23.1%)
Beta-blockers (%)	5 (14.7%)	3 (23.1%)	0 (0.0%)	2 (15.4%)
Calcium-channel blockers (%)	5 (14.7%)	2 (15.4%)	1 (12.5%)	2 (15.4%)
Other anti-hypertensive drug (%) <sup>a</sup>	3(8%)	1(8%)	1(12%)	1(8%)

ACE-inhibitor: Angiotensin Conversion Enzyme-inhibitor, ARB: Angiotensin II Receptor blocker, Standard Deviation: SD. <sup>a</sup> Spironolactone, hydrochlorothiazide. Data are presented as mean ± SD or as percentages.

Table 1: Patients' characteristics at inclusion

	Delemir (n=13)		Aspart (n=8)		Delemir & Aspart (n=13)		Time effect	Interaction
	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	P	P
HbA1c (%)	8.5±1.3	8.4±1.1	9.2±1.3	8.3±1.4	9.3±1.2	8.3±1.0	<0.001	0.0004
HbA1c (mmol/mmol)	69±14	68±12	77±20	67±16	78±13	65±11	<0.001	0.0004
Fructosamine (µM/L)	350.2± 106.2	328.5± 75.2	344.8±71.3	286.8±39.3	373.2±54.3	298.9±43.1	<0.001	0.0141
Fasting PG (mM/L)	10.6±2.6	7.7±2.7	11.3±4.1	9.4±2.5	11.6±3.7	8.1±1.8	0.0025	0.6577
1-hour PP PG (mM/L)	16.0±2.8	12.8±3.8	16.1±5.4	13.9±2.3	17.5±2.5	13.4±3.5	0.0004	0.6413
2-hour PP PG (mM/L)	16.3±2.8	13.5±2.6	16.7±3.6	11.9±2.1	18.5±2.5	12.7±2.5	<0.001	0.1303
Fasting C peptide (pM/L)	330±40	450±295	732±478	565±361	779±341	322±215	<0.001	0.0525
1-hour C peptide (pM/L)	3169±487	901±550	1139±852	1075±788	1128±435	593±302	0.0002	0.1313
2-hour C peptide (pM/L)	3426±509	1131± 341	1157±822	1138±810	1219±468	575±368	0.0008	0.0266
Fasting TC (mM/L)	3.9±1.1	3.5±0.9	4.5±0.3	4.5±0.8	4.3±1.0	4.5±0.7	0.1259	0.5468
1-hour TC (mM/L)	3.7±1.1	3.2±0.6	4.2±0.3	4.2±0.8	4.5±0.8	4.4±0.7	0.6654	0.3390
2-hour TC (mM/L)	3.7±1.1	3.3±0.6	4.2±0.3	4.2±0.9	4.6±0.9	4.5±0.8	0.1047	0.4557
Fasting HDL (mM/L)	1.2±0.4	1.3±0.4	1.3±0.3	1.5±0.4	1.5±0.3	1.3±0.4	0.0147	0.4777
1-hour HDL (mM/L)	1.1±0.3	1.1±0.3	1.3±0.4	1.4±0.4	1.5±0.3	1.3±0.4	0.0029	0.4726
2-hour HDL (mM/L)	1.5±0.3	1.1±0.3	1.5±0.3	1.4±0.4	1.5±0.4	1.4±0.4	0.0053	0.3592
Fasting LDL (mM/L)	2.0±1.0	1.3±0.7	1.5±0.7	2.6±0.7	2.3±0.9	2.7±0.6	0.2486	0.6312
1-hour LDL (mM/L)	1.9±1.0	1.5±0.5	1.5±1.3	2.5±0.6	2.6±0.8	2.5±0.6	0.2695	0.6231

2-hour LDL (mM/L)	1.9±0.9	1.5±0.5	2.5±0.8	2.4±0.7	2.6±0.8	2.6±0.7	0.2031	0.4226
Fasting TG (mM/L)	1.7±0.9	1.2±0.6	1.3±0.5	1.0±0.4	1.7±0.7	1.1±0.6	<0.001	0.7195
1-hour TG (mM/L)	1.6±0.7	1.2±0.5	1.4±0.7	0.9±0.3	1.6±0.7	1.2±0.6	<0.001	0.6805
2-hour TG (mM/L)	1.5±0.8	1.3±0.7	1.3±0.6	1.0±0.4	1.6±0.7	1.1±0.6	<0.001	0.0813
Fasting FFA (µM/L)	565±234	367±180	509±163	609±222	550±158	389±182	0.0353	0.0127
1-hour FFA (µM/L)	372±178	289±154	346±191	242±111	361±157	219±107	0.0016	0.6502
2-hour FFA (µM/L)	187±139	175±132	250±143	78.8±16.8	190±104	81.5±10.0	0.0003	0.0119
UAER (mg/24H)	117±197	200±345	15.6±13.9	12.4±20.2	29.0±46.3	24.4±31.3	0.2110	0.1545

PP: Post Prandial, PG: Plasma Glucose, Cp: C peptide, FFA: Free fatty acids, LDL: Low Density Lipoprotein cholesterol, HDL: High Density Lipoprotein Cholesterol, TG: Triglycerides, TC: Total cholesterol, UAER: Urinary Albumin Excretion Rate.

**Table 2:**

Metabolic parameters during the first visit 1 (V1) and during the second visit (V2), after a 4-week insulin treatment.

	Fasting (n=34)	1-hour post-prandial (n=34)	2-hour post-prandial (n=34)	Time effect p-value
Basal flow				
CBF (PU)	10.3 ± 7.9	14.1 ± 9.4	15.0 ± 11.5	<.0001
CBF variation during deep breathing (%)	79.9 ± 66.6	93.6 ± 63.0	97.9 ± 70.7	0.0238
Acetylcholine stimulation				
Maximal CBF (PU)	28.5 ± 39.2	47.3 ± 42.3	58.1 ± 56.0	<.0001
Peak delay (sec)	118.0 ± 36.4	137.3 ± 47.6	133.0 ± 52.7	0.0463
AUC (PU*sec)	6218 ± 11321	13752 ± 20535	10817 ± 11558	<.0001
Peak tangent (PU/sec)	0.3 ± 0.4	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.5	0.0411
Vasodilation duration (sec)	197.6 ± 96.1	295.7 ± 222.6	234.9 ± 90.8	0.0001

Time effect: repeated measures ANOVA From H0 to H2

Patients took only metformin before breakfast. Data are means±SD

AUC: area under the curve; CBF: cutaneous blood flow; PU: perfusion units

Table 3: Fasting and postprandial cutaneous blood flow before randomization

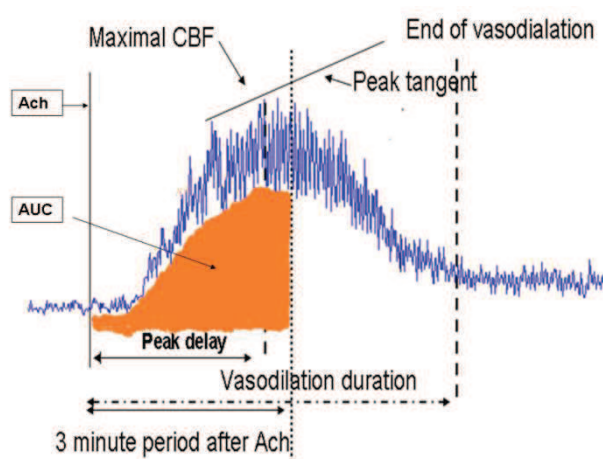
## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Detemir dose adjustment protocol : Early morning glycemia	Dose modification	Delay of modification
<0.56 or nocturnal hypoglycemia	-4 units or -10%	Immediate
0.56-0.71 g/L	-2 ou -5%	Immediate
0.72-1.00 g/L	No modification	
1.01-1.26 g/L	+2	3 Days
1.27-1.55 g/L	+4	3 Days
> 1.57 g/L	+6	3 Days
Aspart dose adjustment protocol: according to 2 hour post prandial glycemia	Dose modification	Delay of modification
<0.56 g/L or hypoglycemia 3 hour post prandially	-4 units or -10%	Immediate
0.56-1.0 g/L	-2 ou -5%	Immediate
1.00- 1.26 g/L	-2 ou -5%	2 Days
1.27-1.40 g/L	No modification	
1.40-1.60 g/L	+2 or +5%	2 Days
1.60-1.80 g/L	+4 or +10%	2 Days
> 1.80 g/L	+6 or +15%	2 Days

Sup Table 1: Insulin adjustment protocol

## Insulin treatment

At V2, total daily dose of insulin was  $0.56 \pm 0.29$  IU/kg of body weight in the Aspart group,  $0.45 \pm 0.20$  IU/kg in the Detemir group and  $0.75 \pm 0.44$  IU/kg in the Aspart / Detemir group ( $p=0.071$ ). Six non severe hypoglycemic events occurred during the 4 week period of insulin treatment, without hypoglycemic events during V1 and V2.



Sup Figure 1: Post Ach CBF curve analysis

Sup Table 2: Biomarkers for oxidative stress and endothelial function at fasting.

	Detemir group (n=13)		Aspart group (n=8)		Detemir & Aspart (n=13)		Time effect	Interaction
	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	p	p
Nitrotyrosine (nmol/L)	33.6±30.2	33.0±31.3	32.9±18.6	32.9±19.3	27.9±30.8	33.5±31.8	0.8423	0.9999
2-hour nitrotyrosine (nmol/L)	35.8 ± 25.2	30.5 ± 18.5	22.7 ± 14.5	35.0 ± 21.6	34.6 ± 18.9	33.6 ± 19.0	0.3752	0.2087
Oxidated LDL (mU/l)	767175 ± 162848	690700 ± 105711	839235 ± 223868	764480 ± 261011	885009 ± 146897	856430 ± 153365	0.1286	0.8305
2-hour oxidated LDL (mU/l)	714857 ± 207811	719507 ± 177296	738947 ± 176764	749583 ± 248242	913699 ± 159034	839035 ± 168393	0.5110	0.5079
VCAM (ng/ml)	613 ± 232	618 ± 229	835 ± 318	757 ± 307	665 ± 151	651 ± 144	0.0467	0.1182
2-hour VCAM (ng/ml)	577 ± 236	571 ± 244	736 ± 286	675 ± 279	612 ± 153	612 ± 192	0.0393	0.1738
E selectin (ng/ml)	52.7 ± 15.3	50.3 ± 15.8	52.6 ± 11.7	51.9 ± 12.0	40.1 ± 11.9	34.8 ± 12.2	0.0367	0.1160
2-hour E selectin (ng/ml)	51.9 ± 15.8	47.1 ± 14.8	52.6 ± 12.7	52.2 ± 11.5	37.8 ± 9.9	35.3 ± 12.1	0.0500	0.2429

Data are means±SD

Data are means  $\pm$  SD. AUC: area under the curve; CBF: cutaneous blood flow; PU: perfusion units

**Sup Table 3:** Cutaneous blood flow at fasting, before (at visit 1) and 4 weeks after insulin treatment (at visit 2).

	Detemir (n=13)		Aspart (n=8)		Detemir & Aspart (n=13)		Time effect	Interaction
	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	p	p
Mean basal CBF (PU)	7.4 $\pm$ 3.8	10.1 $\pm$ 3.6	10.6 $\pm$ 6.5	12.0 $\pm$ 5.8	12.9 $\pm$ 10.7	10.5 $\pm$ 5.5	0.1381	0.1216
CBF variation during deep breathing (%)	98.5 $\pm$ 88.4	70.3 $\pm$ 38.5	67.1 $\pm$ 50.6	68.1 $\pm$ 35.3	69.3 $\pm$ 47.8	87.0 $\pm$ 54.3	0.8636	0.4869
<b>CBF after acetylcholine stimulation</b>								
Maximal CBF (PU)	18.0 $\pm$ 10.3	29.8 $\pm$ 26.6	26.9 $\pm$ 27.2	39.6 $\pm$ 32.8	39.9 $\pm$ 58.6	45.2 $\pm$ 36.2	0.0392	0.9897
Peak delay (sec)	131.5 $\pm$ 32.4	108.5 $\pm$ 43.7	116.6 $\pm$ 41.6	124.4 $\pm$ 50.2	105.3 $\pm$ 34.9	142.7 $\pm$ 37.9	0.3557	0.0048
AUC (PU*sec)	3544 $\pm$ 3067	4960 $\pm$ 3320	8350 $\pm$ 16111	9156 $\pm$ 9967	7578 $\pm$ 13373	12268 $\pm$ 14433	0.0191	0.8045
Peak tangent (PU/sec)	0.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.4	0.2170	0.9678
Vasodilation duration (sec)	192.9 $\pm$ 94.0	210.6 $\pm$ 98.8	218.4 $\pm$ 116.8	221.9 $\pm$ 88.1	189.5 $\pm$ 90.7	283.0 $\pm$ 148.2	0.1594	0.2816

**Sup Table 4:** Postprandial CBF results 1-hour after a standardized breakfast. Data are means  $\pm$  SD

	Detemir (n=13)		Aspart (n=8)		Detemir & Aspart (n=13)		Time effect	Interaction
	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	p	p
Mean CBF (PU)	11.4 $\pm$ 7.3	10.8 $\pm$ 3.7	14.2 $\pm$ 7.7	17.1 $\pm$ 8.6	16.7 $\pm$ 11.8	16.9 $\pm$ 9.7	0.2462	0.7711
CBF variation during deep breathing (%)	95.6 $\pm$ 68.8	62.0 $\pm$ 24.6	76.9 $\pm$ 57.2	59.7 $\pm$ 37.2	101.8 $\pm$ 63.2	99.0 $\pm$ 60.5	0.3290	0.7276
<b>After acetylcholine stimulation</b>								
Maximal CBF (PU)	37.6 $\pm$ 20.2	53.7 $\pm$ 53.6	41.5 $\pm$ 17.3	61.0 $\pm$ 39.9	60.7 $\pm$ 63.3	60.7 $\pm$ 28.1	0.0440	0.9161
Peak delay (sec)	158.4 $\pm$ 55.6	137.4 $\pm$ 44.3	132.4 $\pm$ 34.5	150.1 $\pm$ 48.7	119.2 $\pm$ 39.8	136.0 $\pm$ 52.5	0.6529	0.2184
AUC (PU*sec)	10292 $\pm$ 10513	14488 $\pm$ 18274	19455 $\pm$ 36005	15456 $\pm$ 10736	13411 $\pm$ 14700	15224 $\pm$ 11744	0.2633	0.9920
Peak tangent (PU/sec)	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.6	0.6 $\pm$ 0.4	0.1966	0.6103
Vasodilation duration (sec)	295 $\pm$ 177	320 $\pm$ 236	352 $\pm$ 383	271 $\pm$ 91	257 $\pm$ 103	318 $\pm$ 94	0.5748	0.5139

**Sup Table 5:** Postprandial CBF results 2-hours after a standardized breakfast.Data are means  $\pm$  SD

	Detemir group (n=13)		Aspart (n=8)		Detemir & Aspart (n=13)		Time effect	Interact ion
	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	Visit 1	Visit 2	p	p
Mean CBF (PU)	12.0 $\pm$ 8.3	13.1 $\pm$ 7.6	14.1 $\pm$ 5.3	16.7 $\pm$ 9.0	18.2 $\pm$ 15.8	14.7 $\pm$ 8.7	0.5923	0.7634
CBF variation during deep breathing (%)	89.7 $\pm$ 58.2	77.2 $\pm$ 34.5	117.8 $\pm$ 106.0	71.3 $\pm$ 42.9	92.9 $\pm$ 56.3	101.2 $\pm$ 81.6	0.4324	0.8165
<b>After acetylcholine stimulation</b>								
Maximal CBF (PU)	32.2 $\pm$ 21.8	54.6 $\pm$ 48.8	62.8 $\pm$ 41.9	52.2 $\pm$ 29.6	78.7 $\pm$ 76.5	58.5 $\pm$ 31.7	0.5143	0.0837
Peak delay (sec)	139.6 $\pm$ 42.1	139.8 $\pm$ 40.6	115.5 $\pm$ 50.3	114.0 $\pm$ 52.6	138.7 $\pm$ 63.6	124.5 $\pm$ 33.7	0.8196	0.8446
AUC (PU*sec)	10292 $\pm$ 10513	14488 $\pm$ 18274	19455 $\pm$ 36005	15456 $\pm$ 10736	13411 $\pm$ 14700	15224 $\pm$ 11744	0.3167	0.3390
Peak tangent (PU/sec)	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.9	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.3	0.3947	0.3702
Vasodilation duration (sec)	236.2 $\pm$ 70.5	246.3 $\pm$ 88.7	239.0 $\pm$ 132.0	210.9 $\pm$ 72.0	230.9 $\pm$ 82.7	271.4 $\pm$ 86.8	0.6228	0.6020



### 3.3.3 Petites artères: amélioration de la fonction endothéliale après l'insulinothérapie

#### Poster ADA 2014

L'indice RHI est une mesure de la fonction endothéliale.

Suite à 4 à 5 semaines d'insulinothérapie nous observons une amélioration de la fonction endothéliale après le petit déjeuner standardisé ( $p=0.037$ ). Cette réponse devient est renforcée dès H1, sans que cet effet diffère entre les 3 groupes du traitement. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par le doppler laser lors du test à l'Ach sur la microcirculation cutanée.

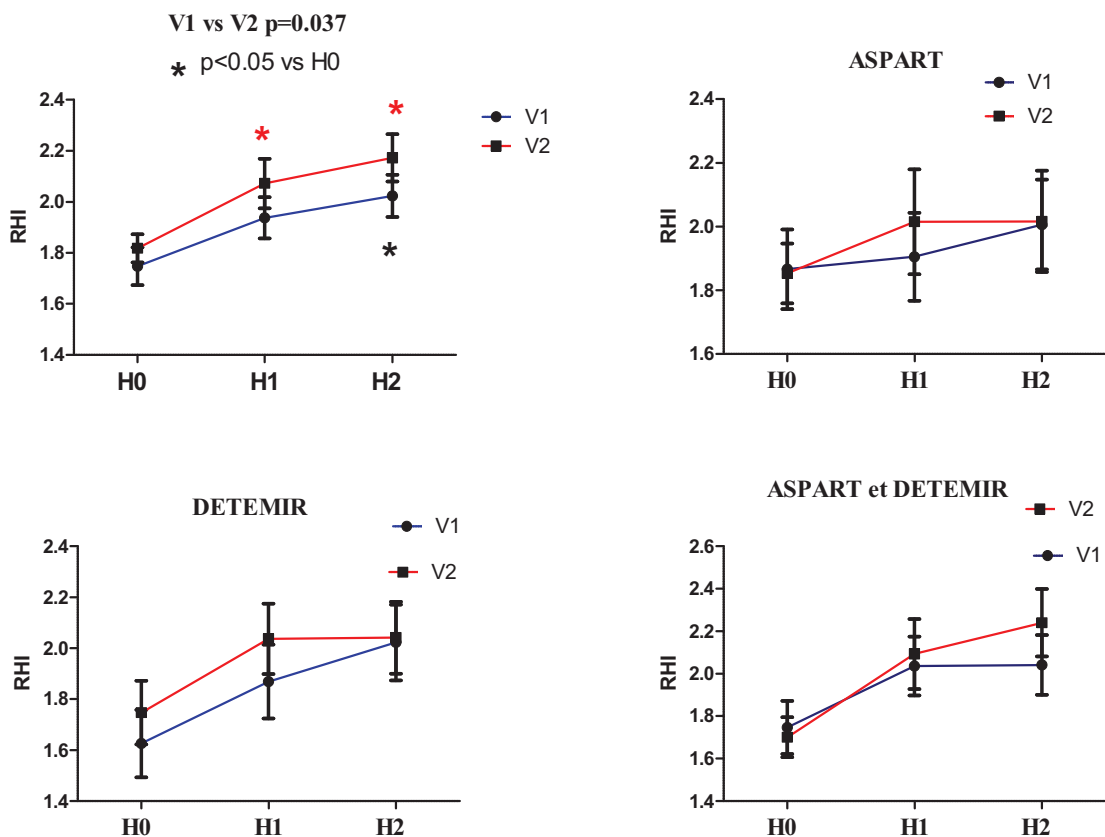


Figure 38 : INSUVASC RHI pour tous les patients et pour les 3 bras de traitement

Resultats fourni par ENDOPAT®

(V1 en bleu et V2 en rouge).  $*p<0.05$  vs H0

### 3.3.4 Le ratio de viabilité sousendocardique est inversement corrélé aux taux de leptine chez les diabétiques de type 2 avant et après traitement à l'insuline.

Poster ADA 2014

Un ratio de viabilité sousendocardique (SEVR) bas est un indice de dysfonctionnement de la microcirculation coronaire. Il existe certaines preuves soutenant un rôle pour la leptine dans la régulation de l'activité sympathique et la microcirculation. Notre objectif était d'examiner la relation entre les taux de leptine et SEVR chez les diabétiques de type 2 à jeun et après le petit déjeuner standard.

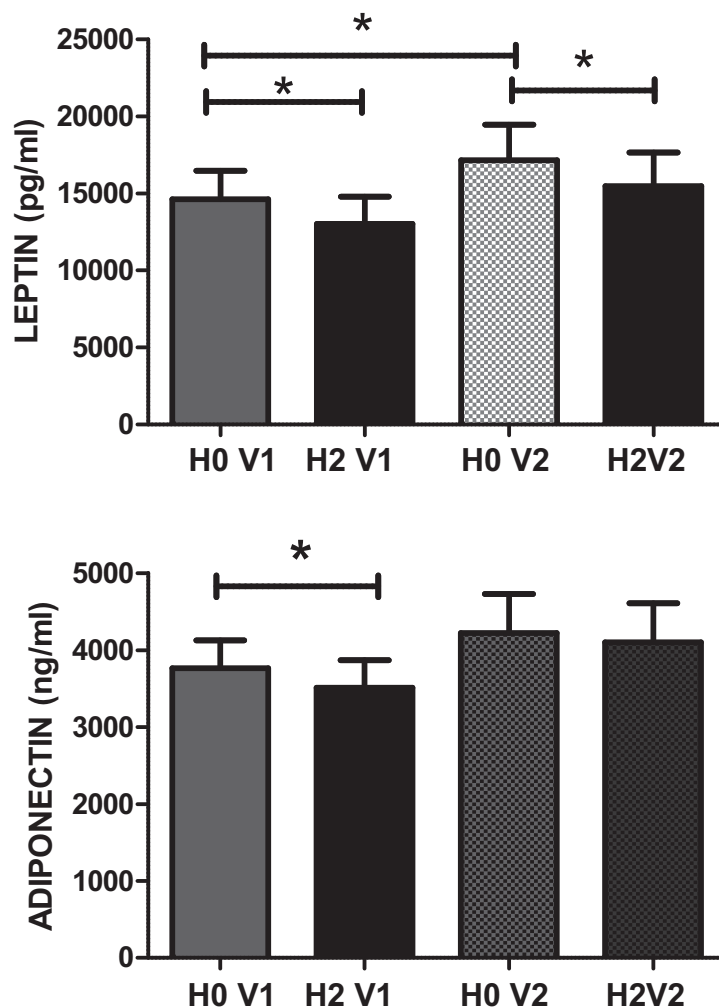


Figure 39: INSUVASC Taux plasmatique de la leptine et de l'adiponectine à V1 et V2

\* $p < 0.005$

La leptine diminue en post prandial et augmente après traitement par l'insuline, l'adiponectine n'est pas modifiée après insulinothérapie.

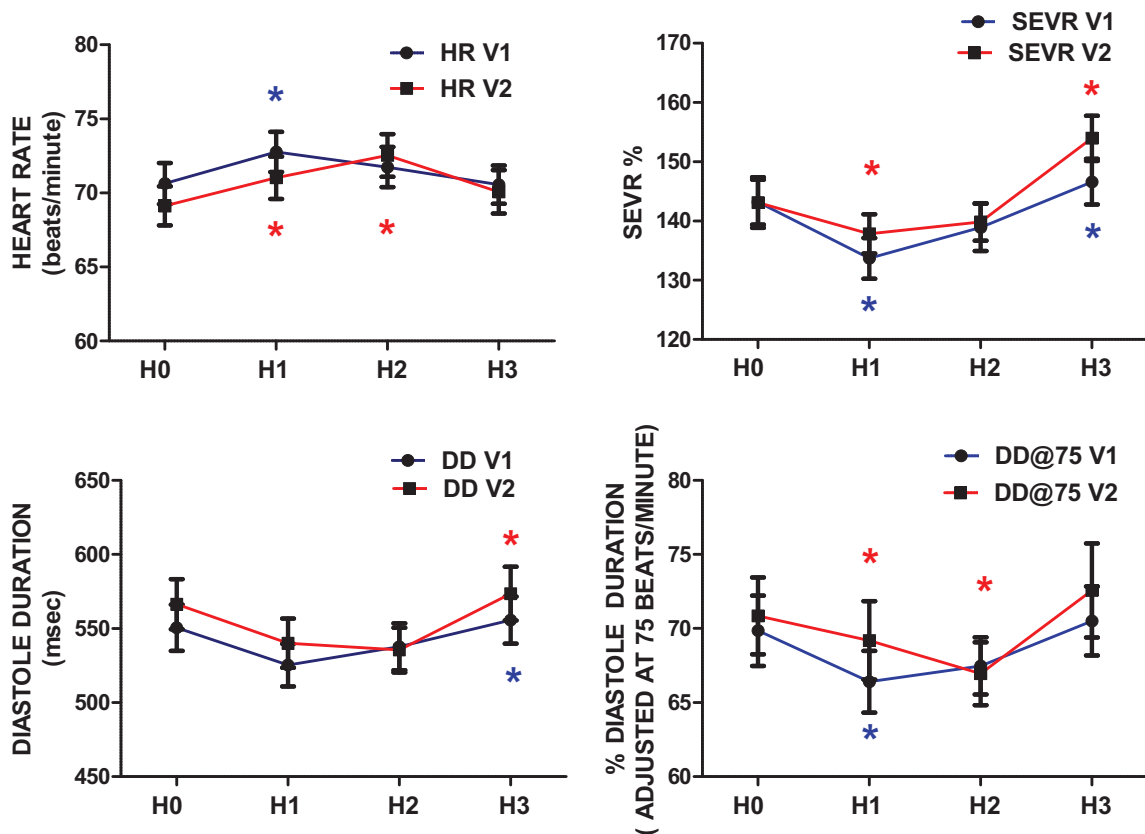


Figure 40: *INSUVASC FC, SEVR, durée de la diastole et durée de la diastole ajusté pour la FC*. \* $p < 0.005$  vs H0.

Le ratio de viabilité sousendocardique augmente significativement à H3 sans différence entre les 3 groupes du traitement. Nous avons observé que les taux de leptine étaient corrélés significativement à SEVR à jeun et en postprandial à la fois avant et après insulinothérapie.

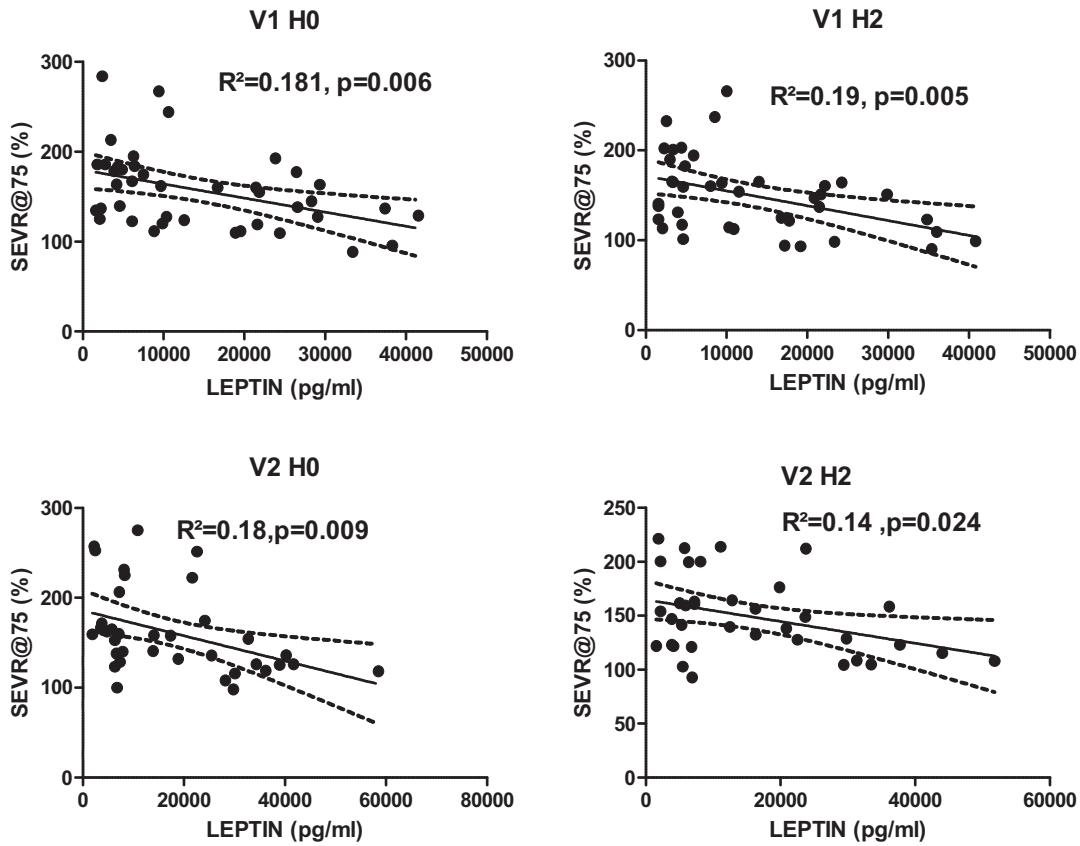


Figure 41: *INSUVASC* Corrélation entre la leptine et SEVR ajusté sur la FC à V1 et V2

La leptine est sécrétée par les adipocytes mais elle est également produite par les cellules musculaires lisses vasculaires et les cardiomyocytes. Des concentrations plasmatiques de leptine sont élevés dans les cas de maladies cardiovasculaires, comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque congestive, l'infarctus du myocarde ou le remodelage cardiaque [512]. Ces résultats suggèrent qu'une hyperleptinémie s'accompagne d'une diminution de la perfusion myocardique. Le rôle propre de la leptine demande à être clarifier.

### 3.3.5 Le traitement insulinique atténue les différences de la durée de diastole liées à l'activité vagale cardiaque indépendamment de la FC

#### Poster Neurodiab 2014

La durée de la diastole (DD) diminue lorsque la FC (FC) s'élève, avec des conséquences potentielles sur la perfusion coronaire. Une faible activité vagale (AV) pourrait participer au raccourcissement de la diastole. Notre objectif était d'étudier chez des diabétiques de type 2 mal équilibrés l'influence de l'AV sur DD sous insulinothérapie.

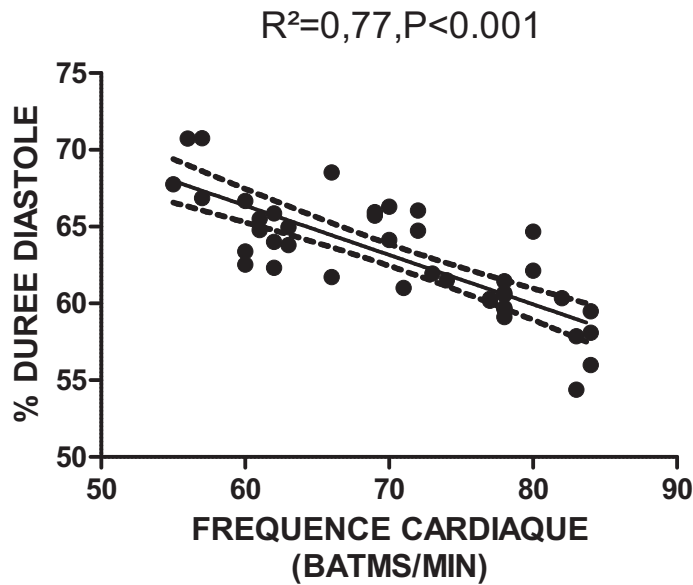


Figure 42: INSUVASC Corrélation entre la durée de la diastole et la FC.

Avant l'insulinothérapie, le pourcentage du temps diastolique par rapport à la durée totale la diastole du cycle cardiaque (DD%) était corrélé inversement avec la FC à jeûn ( $p<0.001$ ).

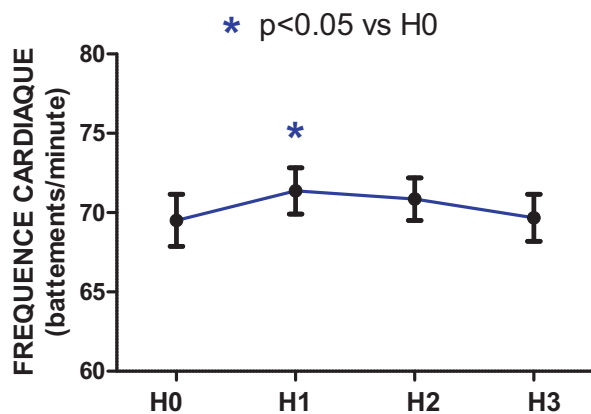


Figure 43: INSUVASC Evolution de FC en post prandial  
La FC augmente à H1.

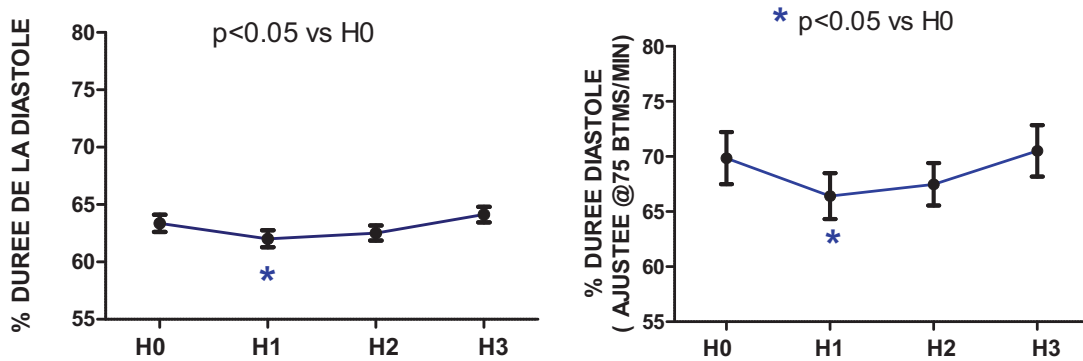


Figure 44: INSUVASC %Durée de la diastole ajusté sur la FC.

Le %DD diminue à H1 et la diminution de %DD était significative après ajustement sur une FC de 75 bpm.

Les patients ont été séparés en 2 groupes selon la valeur de l'amplitude du pic de haute fréquence des variations de FC (HF-HR) qui correspond à l'activité vagale cardiaque : HF > médiane: Activité vagale (AV) élevée, HF < médiane: faible AV.

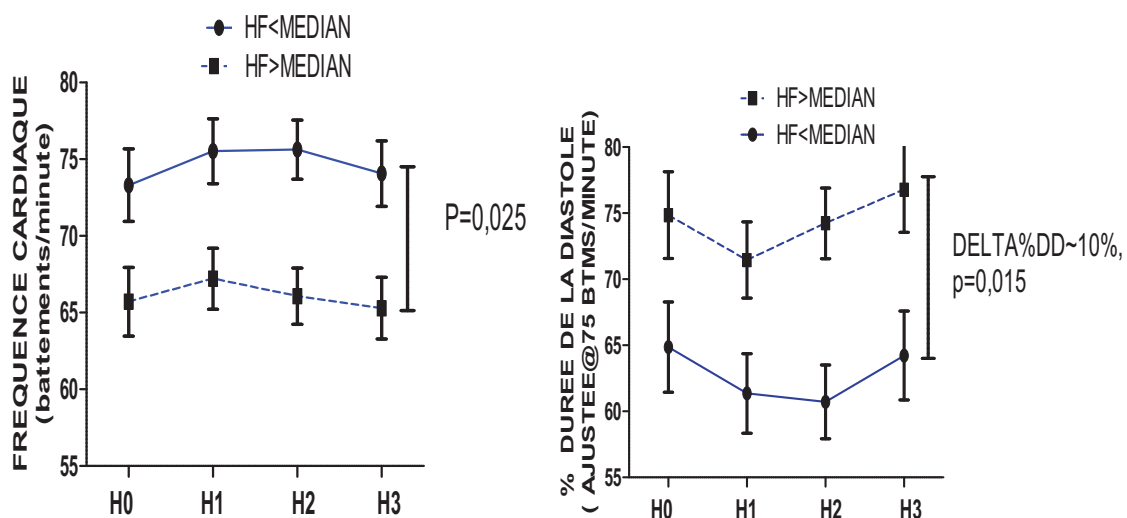


Figure 45: INSUVASC FC et %DD selon l'activité vagale pendant la V1.

Pendant V1 les patients avec une AV élevée avaient une FC moins rapide et un %DD 10% plus élevée par rapport à l'autre groupe, même après ajustement pour une FC à 75 bpm.

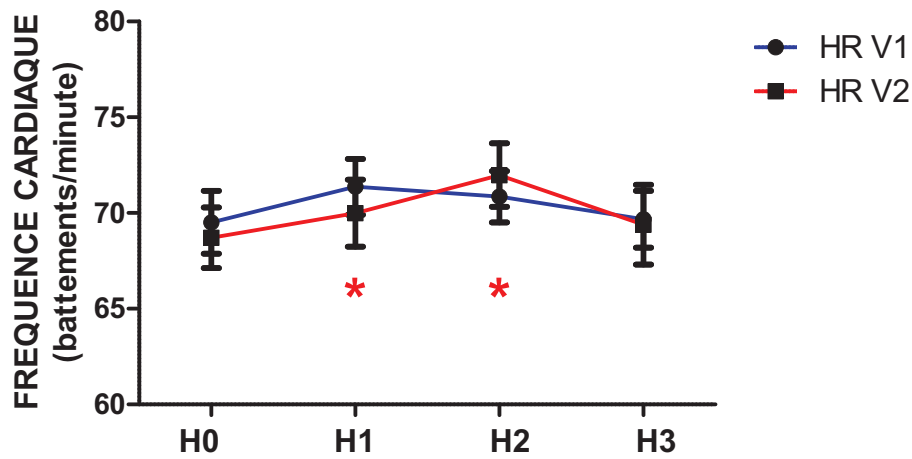


Figure 46: *INSUVASC FC après traitement par insuline.*

La FC augmente à H1 et H2.

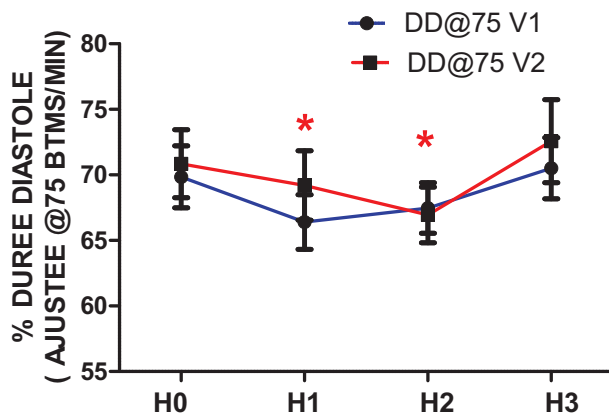


Figure 47: *INSUVASC %DD après traitement par insuline.*

La diminution du %DD était moindre après un ajustement sur une FC de 75bpm à H1 et à H2.

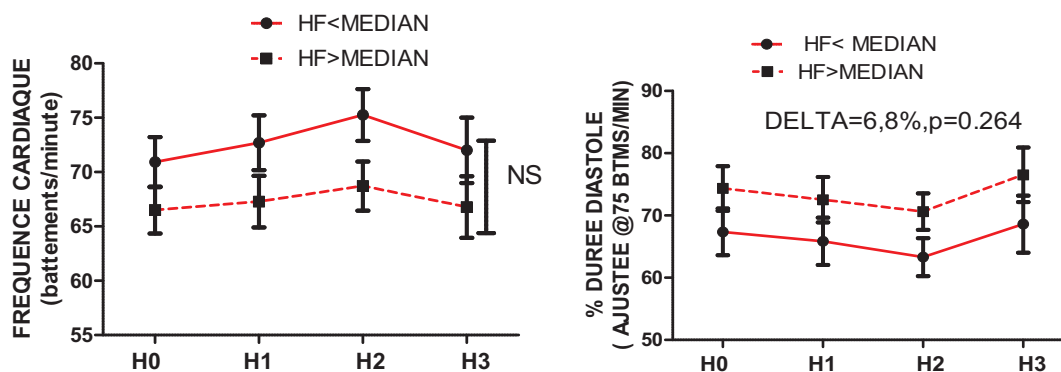


Figure 48: *INSUVASC FC et %DD selon l'activité vagale après traitement par insuline*

Après traitement les différences sur la FC et la DD@75 ont été atténuées (voir Figure 45 pour comparaison avec la V1).

Chez les DT2 une faible activité vagale s'associe à une FC plus élevée et une diastole plus courte. L'insulinothérapie atténue en post-prandial cette influence de l'AV.

### 3.3.6 Modifications de l'activité sympathique cardio-vasculaire sous insulinothérapie chez les diabétiques de type 2 et HTA

Poster ADA 2014

#### 3.3.6.1 Objectif

Au cours d'un clamp euglycémique l'insuline active le sympathique et déprime l'activité vagale cardiaque. Notre objectif était d'examiner les modifications vagosympathiques chez des diabétiques de type 2 mal équilibrés, à jeûn et en post-prandial, avant et sous insulinothérapie.

Patients et méthodes: parmi les patients de l'étude INSUVASC avec un diabète de type 2, 24 participants avaient des enregistrements de Finapres (variations de la FC et de la pression artérielle) de bonne qualité pour les 4 temps du test (H0-H3). Les paramètres hémodynamiques ont été mesurés par tonométrie d'aplanation.

#### 3.3.6.2 Résultats

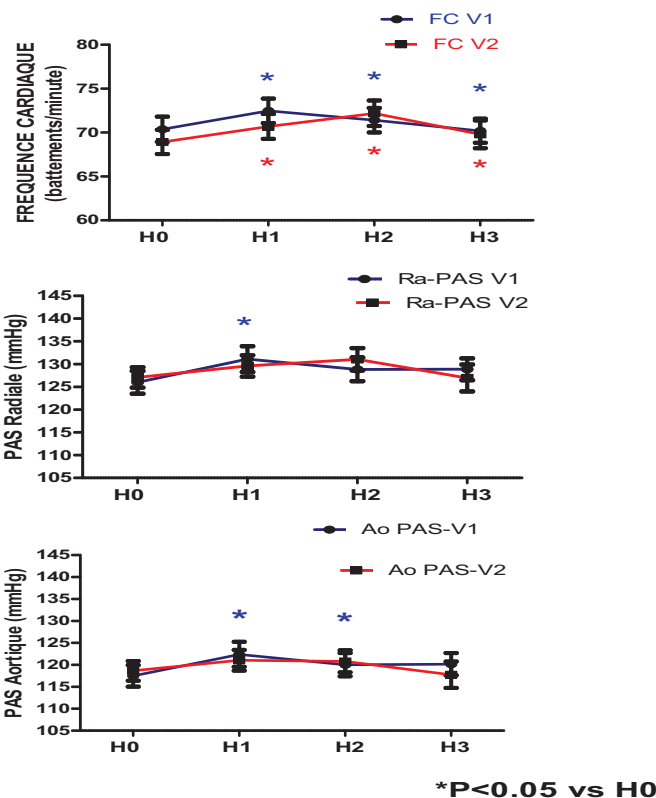




Figure 49: INSUVASC Modifications hémodynamiques.

La FC augmente à H1 et H2 en post prandial avant et après traitement par insuline.

La PAS radiale et aortique augmente en post prandial seulement avant traitement par insuline (Figure 49:).

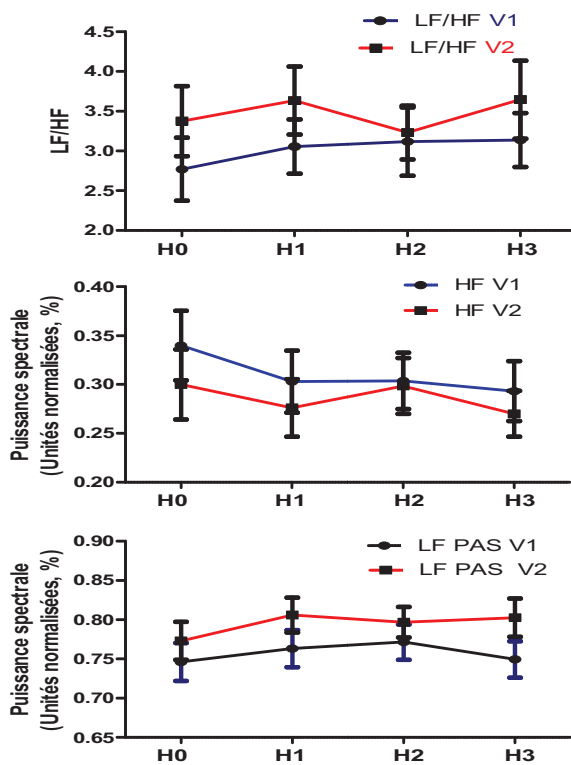
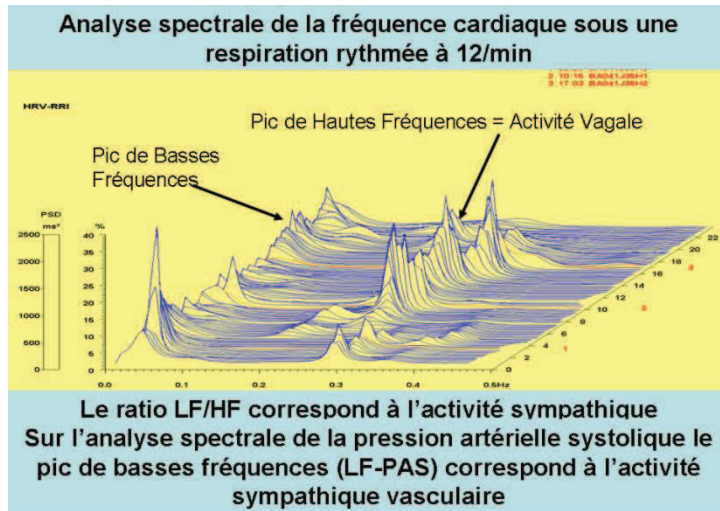


Figure 50: INSUVASC Evolution de la balance sympatho-vagale V1 et V2.

Après insuline la balance sympatho-vagale (LF/HF) et l'activité sympathique ne sont pas modifiées significativement de même que l'amplitude du pic LF-PAS ce qui témoigne de l'activité sympathique vasculaire.

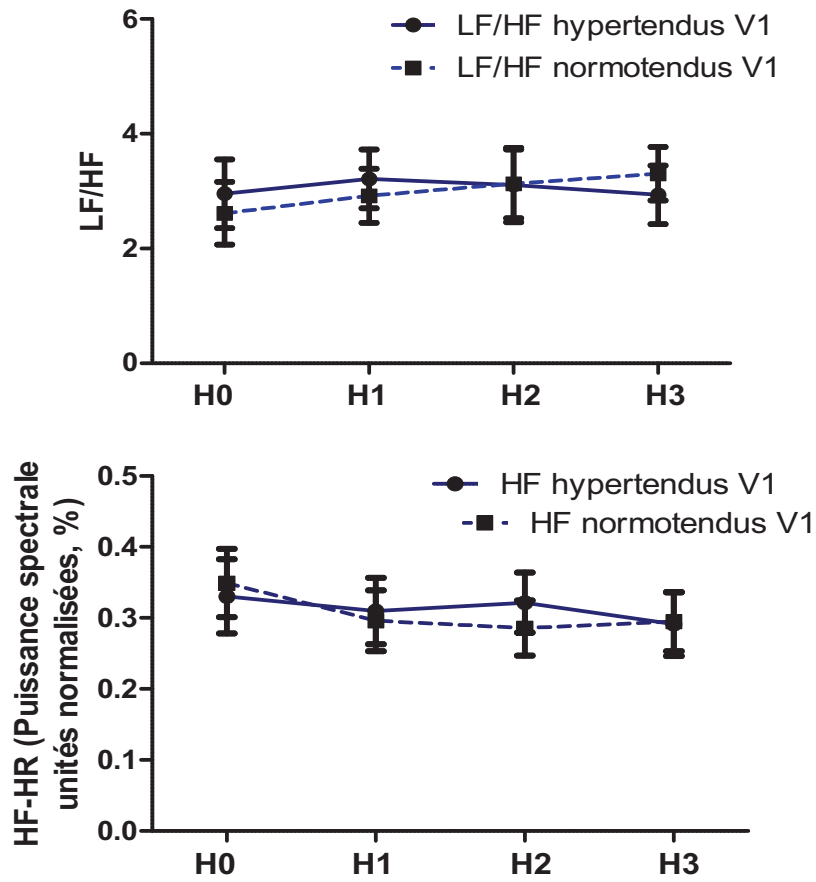


Figure 51: *INSUVASC Analyse spectrale à V1.*

Pendant la visite 1, avant traitement par insuline, les profils de LF/HF de FC et HF-FC sont similaires entre les diabétiques normotendus ou hypertendus.

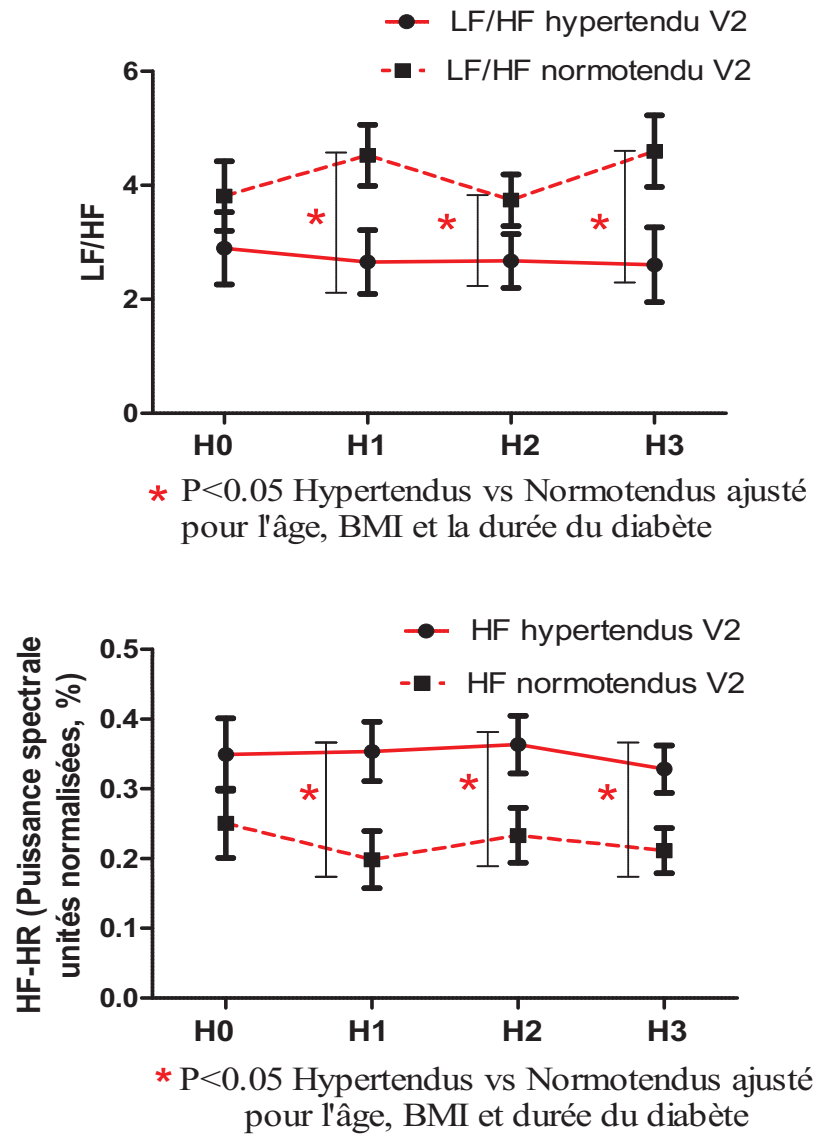


Figure 52: INSUVASC V2, analyse spectrale de la variabilité de la FC.

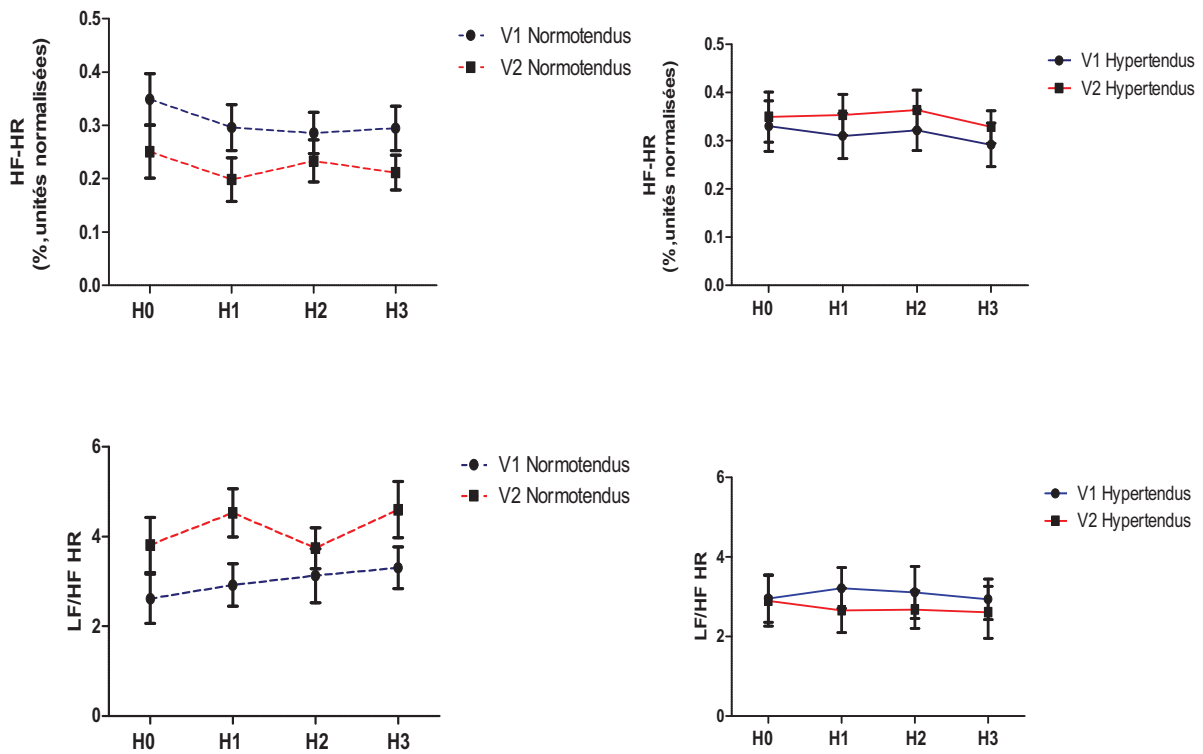


Figure 53: *INSUVASC* V1 et V2, analyse spectrale de la variabilité de la FC pour les normotendus vs hypertendus

Pendant la visite 2 après traitement par insuline, l'activité autonome est modifiée chez les normotendus (activation sympathique et inhibition vagale) et pas chez les hypertendus.

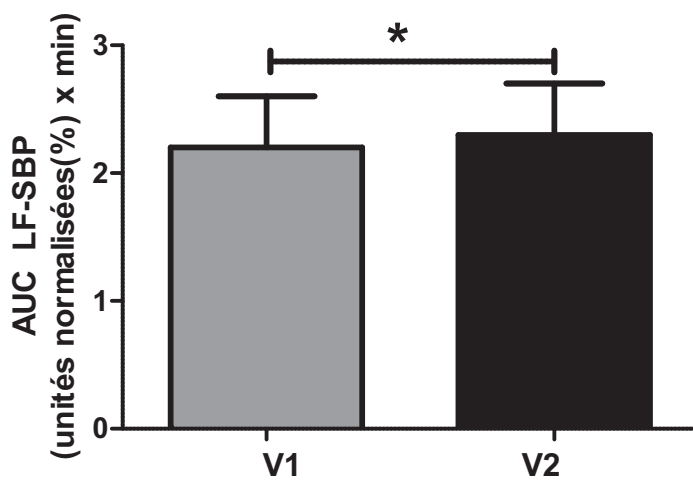
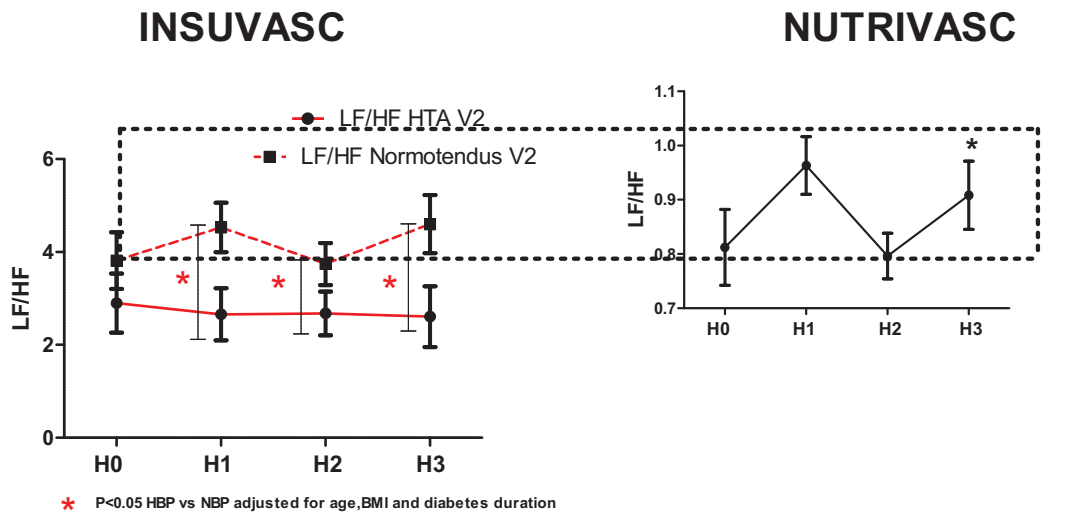


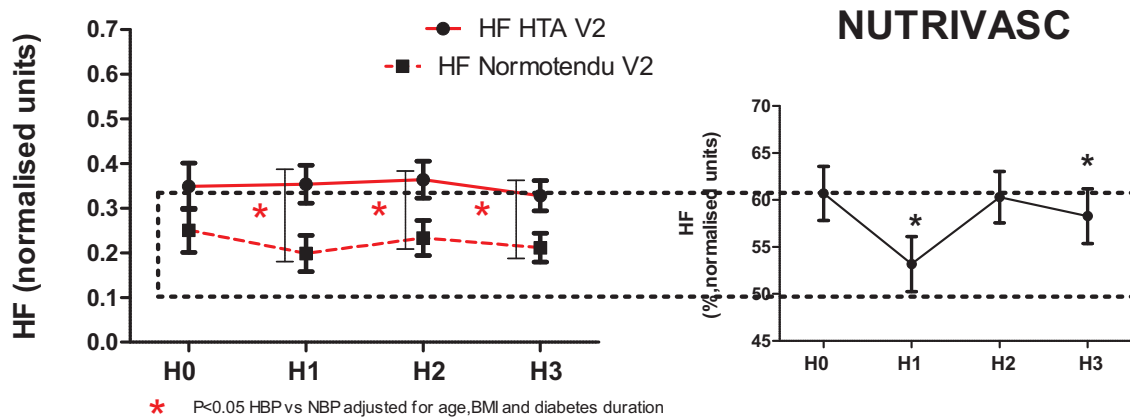
Figure 54: *INSUVASC* Aire sous le courbe LF-PAS V1 vs V2, \* $p < 0.05$

La réponse vasculaire sympathique totale exprimée par l'aire sous la courbe post-prandiale de LF-PAS de H0 à H3 était augmentée après insuline par rapport à V1 (p=0,027) indiquant une activation sympathique vasculaire.

Chez les DT2 l'insulinothérapie induit une activation sympathique et une dépression vagale à jeun et en post-prandial seulement chez les normotendus cela sans modification tensionnelle probablement à cause de l'effet vasodilatateur de l'insuline.



L'écart est surtout due à la tendance à monter de l'activité sympathique pp chez les normotendus



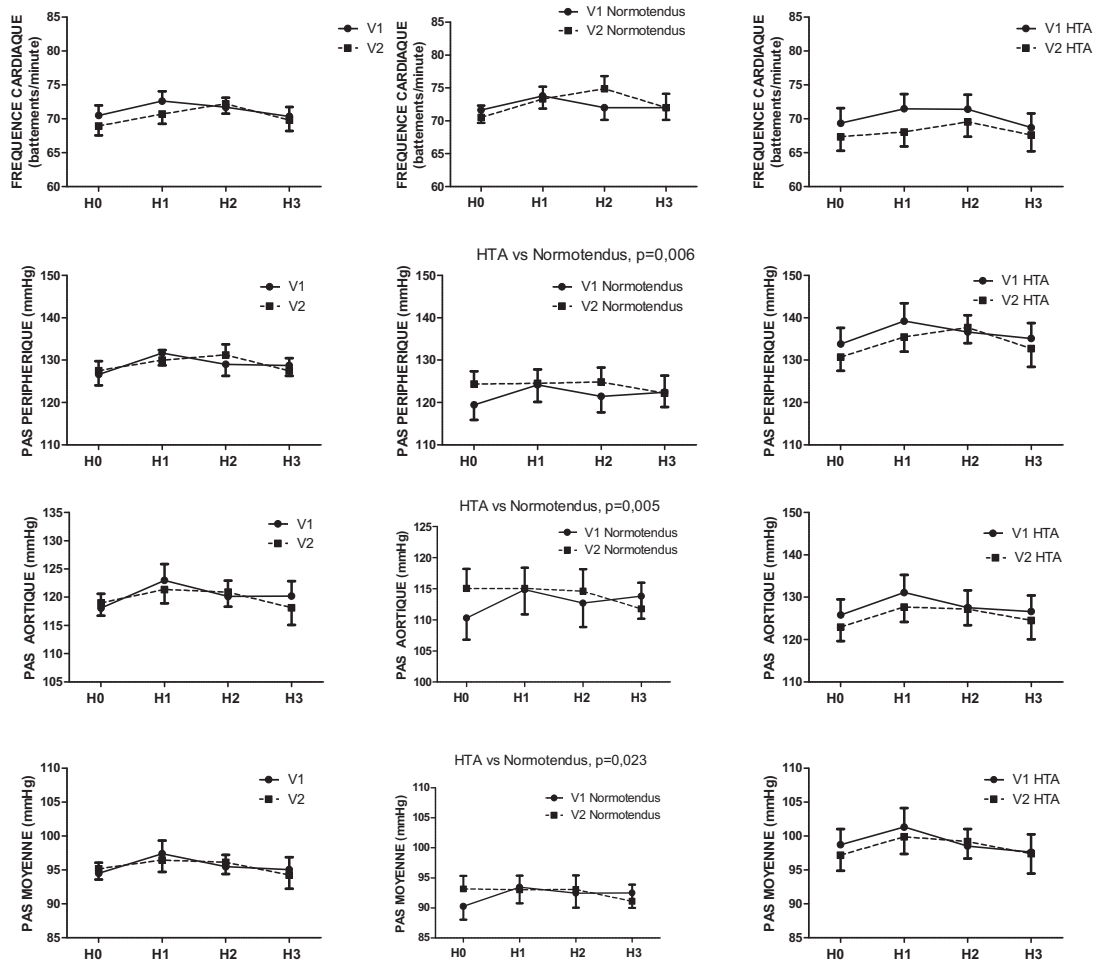
L'écart est surtout due à la tendance à la baisse de l'activité vagale pp chez les normotendus

**Figure 55: Réponse autonome cardiaque dans les études INSUVASC et NUTRIVASC**  
Suite à un traitement par insuline chez des DT2 (à gauche) et chez des sujets sains à droite (NUTRIVASC).

Le traitement par insuline semble rétablir l'aspect de la réponse autonome physiologique postprandiale comme décrite dans l'étude NUTRIVASC chez les diabétiques normotendus et non chez les diabétiques hypertendus.

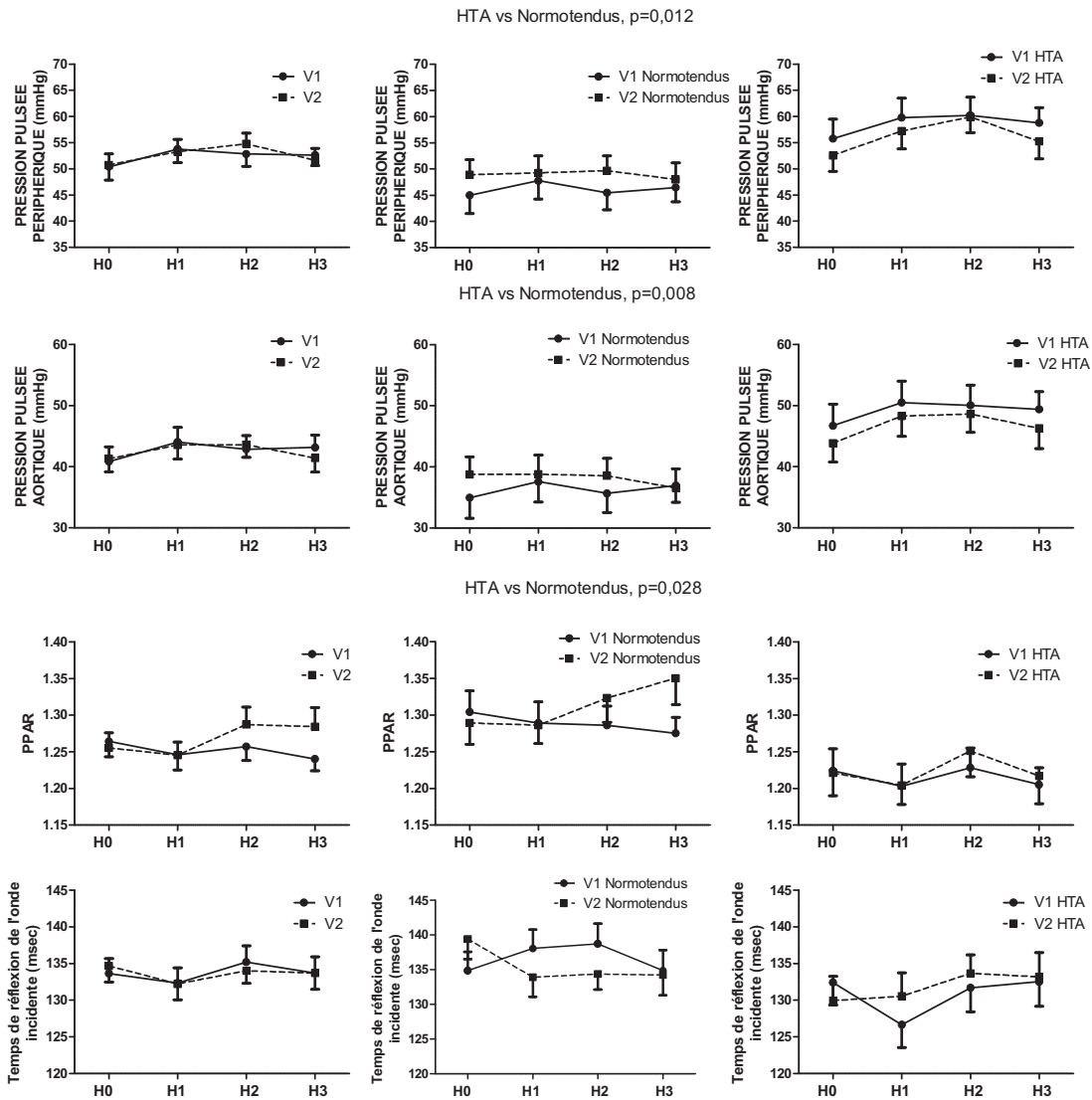
### 3.3.7 Traitement par insuline, rigidité artérielle, fonction endothéliale et HTA

Parmi les patients diabétiques de l'étude INSUVASC, 18 étaient hypertendus (HTA) que nous avons comparés avec les patients diabétiques normotendus afin de voir si la réponse post prandiale de la rigidité artérielle et de la fonction endothéliale était modifiée en présence ou pas d'une HTA.



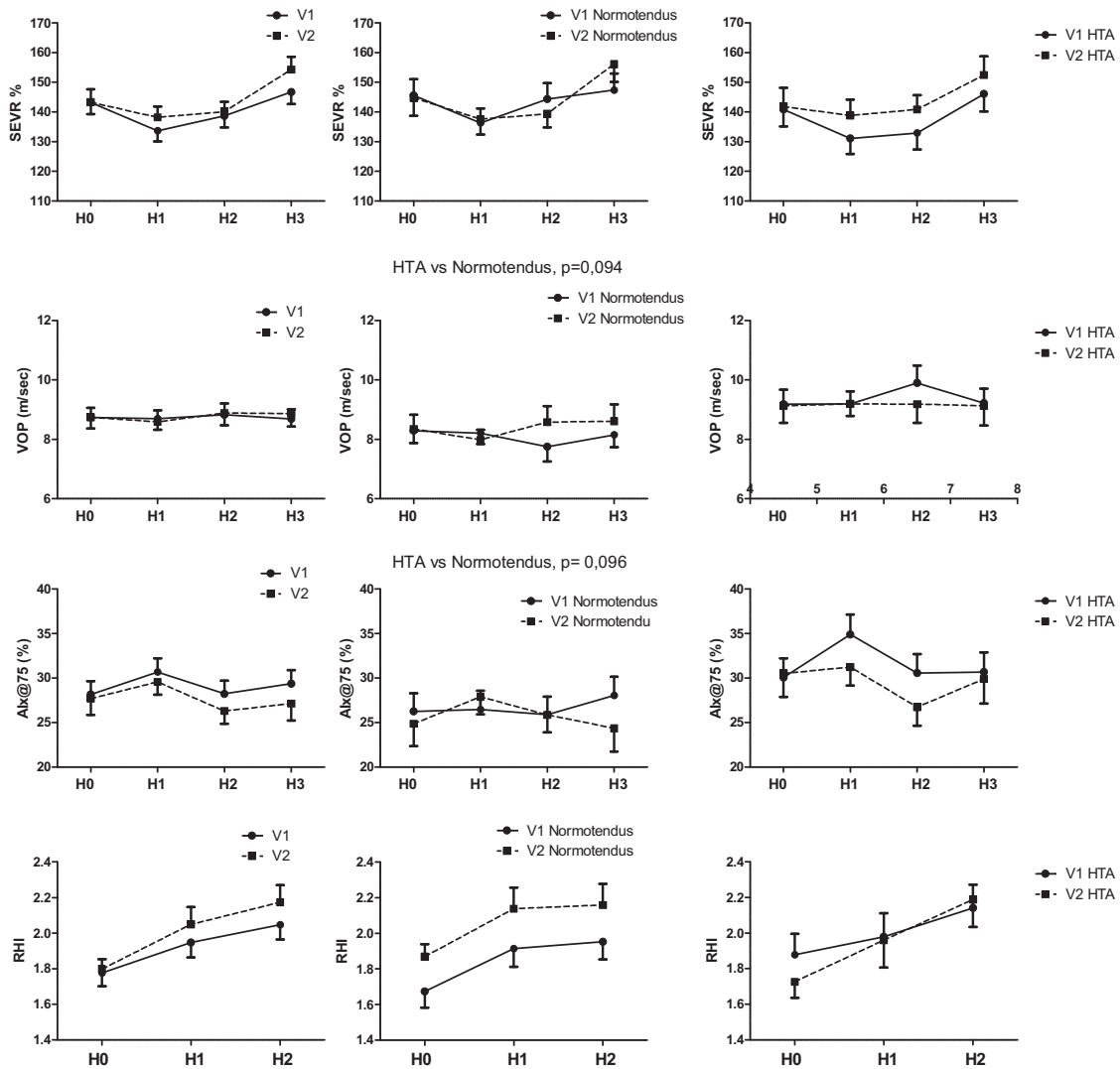
**Figure 56: INSUVASC Résultats sur la FC, PAS radiale, PAS Aortique et PA moyenne.**  
*A gauche tous les patients, au milieu les normotendus et à droite les hypertendus (V1: visite 1 et V2: Visite 2).*

PAS radiale, PAS aortique et PA moyenne étaient plus élevées chez les patients hypertendus mais elles n'étaient pas modifiées après un traitement par insuline.



**Figure 57: INSUVASC Pressions pulsées périphériques et centrales, ratio d'augmentation des pressions pulsées et le de réflexion de l'onde incidente**  
*A gauche tous les patients, au milieu les normotendus et à droite les hypertendus (V1: visite 1 et V2: Visite 2).*

Les PP radiale et aortique étaient plus élevées chez les patients hypertendus mais elles n'étaient pas modifiées après traitement par insuline. Le PPAR était plus élevé chez les normotendus et n'était pas modifié après traitement par insuline. Le temps de réflexion de l'onde incidente était modifié après l'insuline en post prandiale (Interaction V12\*H0H3\*HTA,  $p= 0,05$ )



**Figure 58: INSUVASC SEVR, Alx@75, VOP et RHI.**

*A gauche tous les patients, au milieu les normotendus et à droite les hypertendus (V1: visite 1 et V2: Visite 2).*

En post prandial la VOP était différente après le traitement par l'insuline pour les hypertendus vs Normotendus (Interaction V12\*H0H3\*HTA,  $p=0,05$ ). La fonction endothéliale a été améliorée (Interaction V12\*HTA,  $p=0,013$ ) chez les normotendus seulement.

## Conclusion

La réponse post prandiale du temps de reflexion de l'onde incidente, de la VOP et de la fonction endothéliale après un traitement par insuline est différente selon la présence ou pas d'une HTA.



### 3.4 Comparaison des intégrateurs du risque cardiovasculaire entre les sujets sains de l'étude NUTRIVASC vs les patients diabétiques de l'étude INSUVASC (visite 1)

#### 3.4.1 Objectif

La comparaison des patients diabétiques avant mise à l'insuline avec des sujets sains nous permet d'évaluer les modifications que le diabète peut apporter sur la réponse post prandiale des intégrateurs du risque cardiovasculaire suite à un repas standardisé qui inclut à 75 g de glucides.

#### 3.4.2 Caractéristiques des deux groupes

	Total (n=90)	NUTRIVASC (n=49)	INSUVASC V1 (n=41)	<i>p</i>
Age (années)	60,2 ± 9,6	65,4 ± 5,6	54,2 ± 9,9	<0,001
Sexe (H/F)	32 / 58	12 / 37	20 / 21	0,026
Taille (cm)	164,9 ± 9,4	165,1 ± 8,6	164,5 ± 10,4	0,776
Poids (kg)	71,1 ± 14,6	64,4 ± 13,3	79,2 ± 11,8	<0,001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,1 ± 5,0	23,5 ± 3,4	29,3 ± 4,6	<0,001
Tour de taille (cm)	88,5 ± 14,3	79,8 ± 11,9	98,9 ± 9,1	<0,001
Tour de hanche (cm)	100,3 ± 10,2	96,9 ± 9,5	104,4 ± 9,5	<0,001
PAS (mmHg)	126,9 ± 16,5	125,4 ± 15,6	128,7 ± 17,6	0,358
PAD (mmHg)	78,3 ± 9,9	80,0 ± 10,1	76,2 ± 9,4	0,070

Tableau 17: NUTRIVASC et INSUVASC caractéristiques des deux groupes

Les participants diabétiques de type 2 de l'étude INSUVASC comparés au sujets sains sans facteur de risque cardiovasculaire de l'étude NUTRIVASC étaient plus jeunes, avec un poids corporel, un BMI et un tour de taille plus élevés. Il y avait plus des femmes dans le groupe NUTRIVASC.

### 3.4.3 Résultats à jeun (H0)

#### 3.4.3.1 Biologie

	Total (n=90)	NUTRIVASC (n=49)	INSUVASC V1 (n=41)	<i>p</i>
HbA1c (%)	7,1 ± 2,1	5,4 ± 0,3	9,0 ± 1,4	<0,001
Fructosamine (µmol/L)	286,8 ± 83,3	233,1 ± 21,7	351,0 ± 84,5	<0,001
Glycémie H0 (mmol/L)	7,8 ± 3,8	5,0 ± 0,4	11,3 ± 3,1	<0,001
Cholestérol total H0 (mmol/L)	5,3 ± 1,2	6,0 ± 0,9	4,5 ± 1,1	<0,001
HDL H0 (mmol/L)	1,6 ± 0,6	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,4	<0,001
LDL H0 (mmol/L)	3,1 ± 1,0	3,6 ± 0,8	2,5 ± 1,0	<0,001
Triglycerides H0 (mmol/L)	1,3 ± 0,7	1,0 ± 0,6	1,7 ± 0,7	<0,001
Microalbuminurie (mg/L)	54,2 ± 227,1	6,9 ± 10,8	116,4 ± 337,9	0,031

Tableau 18: NUTRIVASC et INSUVASC *biologie à H0 pour les deux groupes*

Les participants diabétiques de type 2, comme attendu, avaient des indices du métabolisme glucidique et des triglycérides plus élevés et un taux de HDL-cholesterol plus bas. Leurs taux de LDL-cholesterol étaient inférieurs probablement sous l'effet des traitements hypolipémiants.

#### 3.4.3.2 Rigidité artérielle

	Total (N=90)	NUTRIVASC (N=49)	INSUVASC V1 (N=41)	<i>p</i>
FC (bat/min)	66,0 ± 9,7	62,1 ± 8,4	70,6 ± 9,1	<0,001
PASP (mmHg)	124,9 ± 16,2	125,3 ± 16,2	124,5 ± 16,4	0,813
PADP (mmHg)	78,3 ± 10,1	80,1 ± 10,3	76,1 ± 9,5	0,060
PAM (mmHg)	95,6 ± 11,7	97,5 ± 12,2	93,4 ± 10,9	0,097
PPP (mmHg)	47,1 ± 13,2	45,2 ± 10,0	49,4 ± 16,0	0,137
PAS_C (mmHg)	117,9 ± 16,0	119,8 ± 15,5	115,7 ± 16,4	0,223
PAD_C (mmHg)	79,3 ± 10,1	81,0 ± 10,4	77,1 ± 9,5	0,067
PPC (mmHg)	39,2 ± 12,4	38,8 ± 9,0	39,8 ± 15,6	0,711
PPAR	1,22 ± 0,11	1,17 ± 0,06	1,27 ± 0,13	<0,001
SEVR (%)	156,6 ± 28,7	166,9 ± 29,5	144,1 ± 22,4	<0,001
Cycle Cardiaque (msec)	929,0 ± 144,2	983,9 ± 144,9	863,4 ± 113,8	<0,001
Diastole (msec)	604,4 ± 128,7	651,7 ± 132,3	547,9 ± 99,2	<0,001
Diastole (% CC)	64,5 ± 3,9	65,7 ± 3,7	63,1 ± 3,8	0,002
AiXC (%)	32,7 ± 9,1	35,7 ± 6,6	29,2 ± 10,4	<0,001
Aix@75C (%)	28,4 ± 7,8	29,6 ± 6,0	27,0 ± 9,3	0,124
TR (msec)	136,2 ± 11,1	138,1 ± 9,7	133,9 ± 12,2	0,070
PWV (m/sec)	8,1 ± 2,2	7,3 ± 2,1	9,1 ± 1,9	<0,001

Tableau 19: NUTRIVASC et INSUVASC *rigidité artérielle*

Les sujets sains de NUTRIVASC avaient une FC moins rapide même après ajustement pour l'âge ( $p < 0,001$ ). Il n'y avait pas de différence significative entre les 2 groupes pour les

pressions artérielles périphériques et ou centrales. L'augmentation des pressions pulsées (PPAR) était plus importante dans le groupe INSUVASC mais cette différence n'était plus significative après ajustement pour l'âge et la FC ( $p=0,525$ ). La durée du cycle cardiaque, de la diastole en msec ou exprimée comme % du cycle cardiaque (DD%) n'étaient plus significative après ajustement pour l'âge et la FC. L'indice SEVR présentait une tendance après ajustement pour l'âge et la FC dans le groupe NUTRIVASC ( $p=0,067$ ,  $160.7 \pm 2.8$  vs  $151.7 \pm 3.1$  msec). Les résultats les plus impressionnants concernent la VOP même après ajustement pour l'âge et la FC étant plus forte chez les patients diabétiques ( $p < 0,001$ ).

### 3.4.3.3 Fonction endothéliale (petites artères) et flux sanguin cutané

	Total (N=90)	NUTRIVASC (N=49)	INSUVASC V1 (N=41)	<i>p</i>
<b>RHI</b>	2,0 ± 0,5	2,2 ± 0,5	1,8 ± 0,4	<0,001
<b>Aix@75 H0</b>	14,5 ± 11,7	15,0 ± 11,0	13,9 ± 12,7	0,671
<b>FSC (unités de perfusion)</b>	8,2 ± 5,9	6,6 ± 3,1	10,3 ± 7,9	0,005

**Tableau 20: NUTRIVASC et INSUVASC fonction endothéliale et microcirculation.**

Après ajustement pour l'âge et la FC l'indice RHI de fonction endothéliale restait plus élevé dans le groupe NUTRIVASC ( $p=0,020$ ). Le groupe INSUVASC conservait un FSC élevé après ajustement pour l'âge et la FC ( $p=0,016$ ).

### 3.4.4 Résultats pendant la période post prandiale

#### 3.4.4.1 Biologie

	Total (n=90)	NUTRIVASC (n=49)	INSUVASC V1 (n=41)	<i>p</i>
Glycémie H1 (mmol/L)	12,0 ± 4,9	8,3 ± 1,5	16,5 ± 3,6	<0,001
Glycémie H2 (mmol/L)	11,6 ± 5,7	6,9 ± 1,3	17,3 ± 3,1	<0,001
Glycémie H3 (mmol/L)	10,1 ± 5,5	5,5 ± 0,9	15,5 ± 3,4	<0,001
Cholestérol total H1 (mmol/L)	4,9 ± 1,1	5,4 ± 0,8	4,3 ± 1,1	<0,001
Cholestérol total H2 (mmol/L)	4,9 ± 1,1	5,4 ± 0,8	4,3 ± 1,1	<0,001
Cholestérol total H3 (mmol/L)	5,0 ± 1,2	5,7 ± 0,8	4,3 ± 1,2	<0,001
HDL H1 (mmol/L)	1,5 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4	<0,001
HDL H2 (mmol/L)	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4	<0,001
HDL H3 (mmol/L)	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,6	<0,001
LDL H1 (mmol/L)	2,9 ± 1,0	3,3 ± 0,7	2,4 ± 1,0	<0,001
LDL H2 (mmol/L)	2,9 ± 0,9	3,3 ± 0,7	2,4 ± 0,9	<0,001
LDL H3 (mmol/L)	2,9 ± 1,0	3,5 ± 0,7	2,3 ± 1,0	<0,001
Triglycerides H1 (mmol/L)	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,4	1,6 ± 0,7	<0,001
Triglycerides H2 (mmol/L)	1,2 ± 0,7	0,8 ± 0,4	1,6 ± 0,7	<0,001
Triglycerides H3 (mmol/L)	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,5	1,6 ± 0,8	<0,001

Tableau 21: NUTRIVASC et INSUVASC Paramètres métaboliques en post prandial.

Les écarts entre les 2 groupes sont dans la même sensé qu'à jeun.

#### 3.4.4.2 Rigidité artérielle

L'analyse des données a été effectuée par Analyse de la Variance pour des mesures répétées en utilisant l'appartenance dans le groupe NUTRIVASC ou INSUVASC comme facteur de différence entre les sujets (between subjects factor). Les résultats ont été ajustés sur l'âge qui était la covariable d'ajustement dans tous les modèles. La présence d'une interaction signifie que la réponse post prandiale (effet temps) est différente en fonction du groupe. Les résultats NUTRIVASC vs INSUVASC qui présentent une différence significative signifient que la moyenne de la variable considérée pendant les 4 temps du test (H0, H1, H2, H3) est différente par rapport à l'autre groupe.

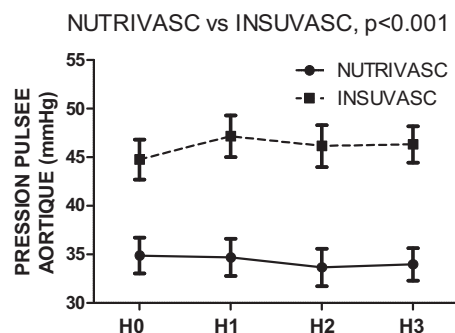
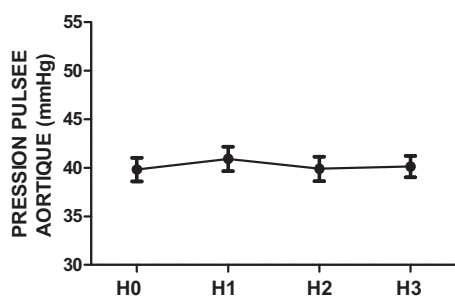
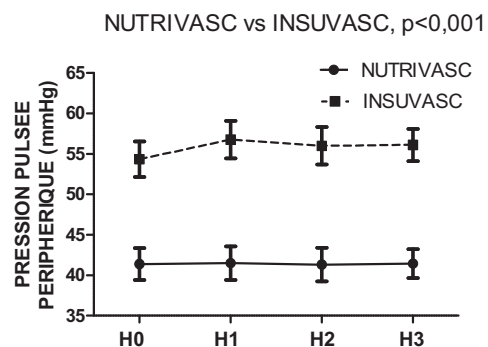
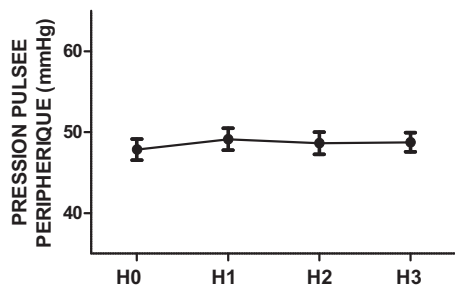
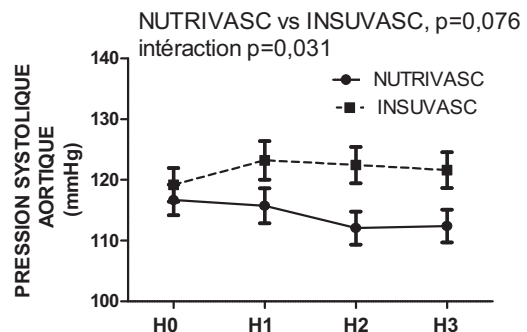
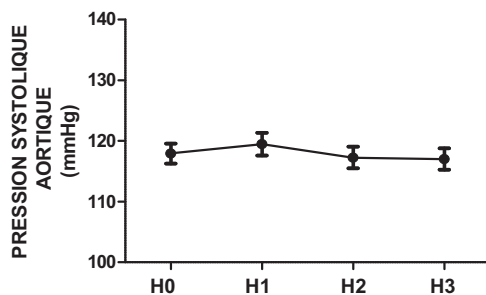
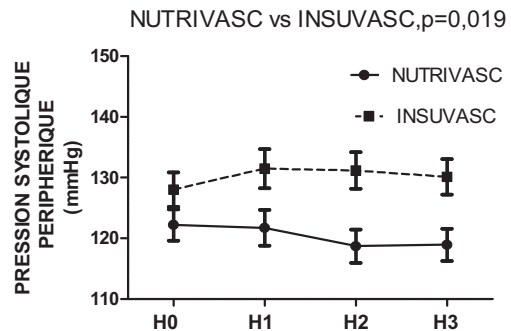
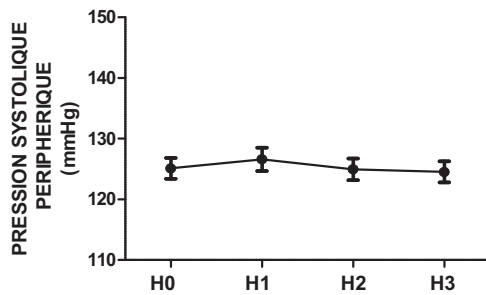
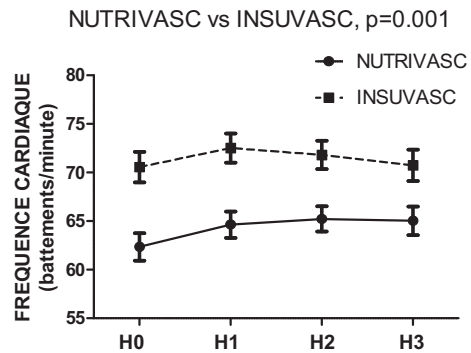
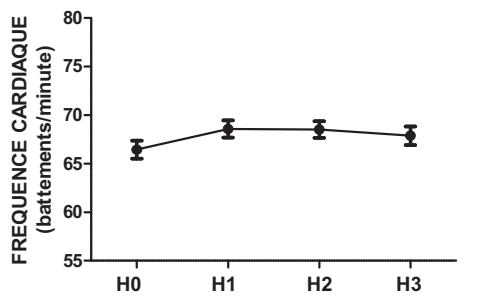
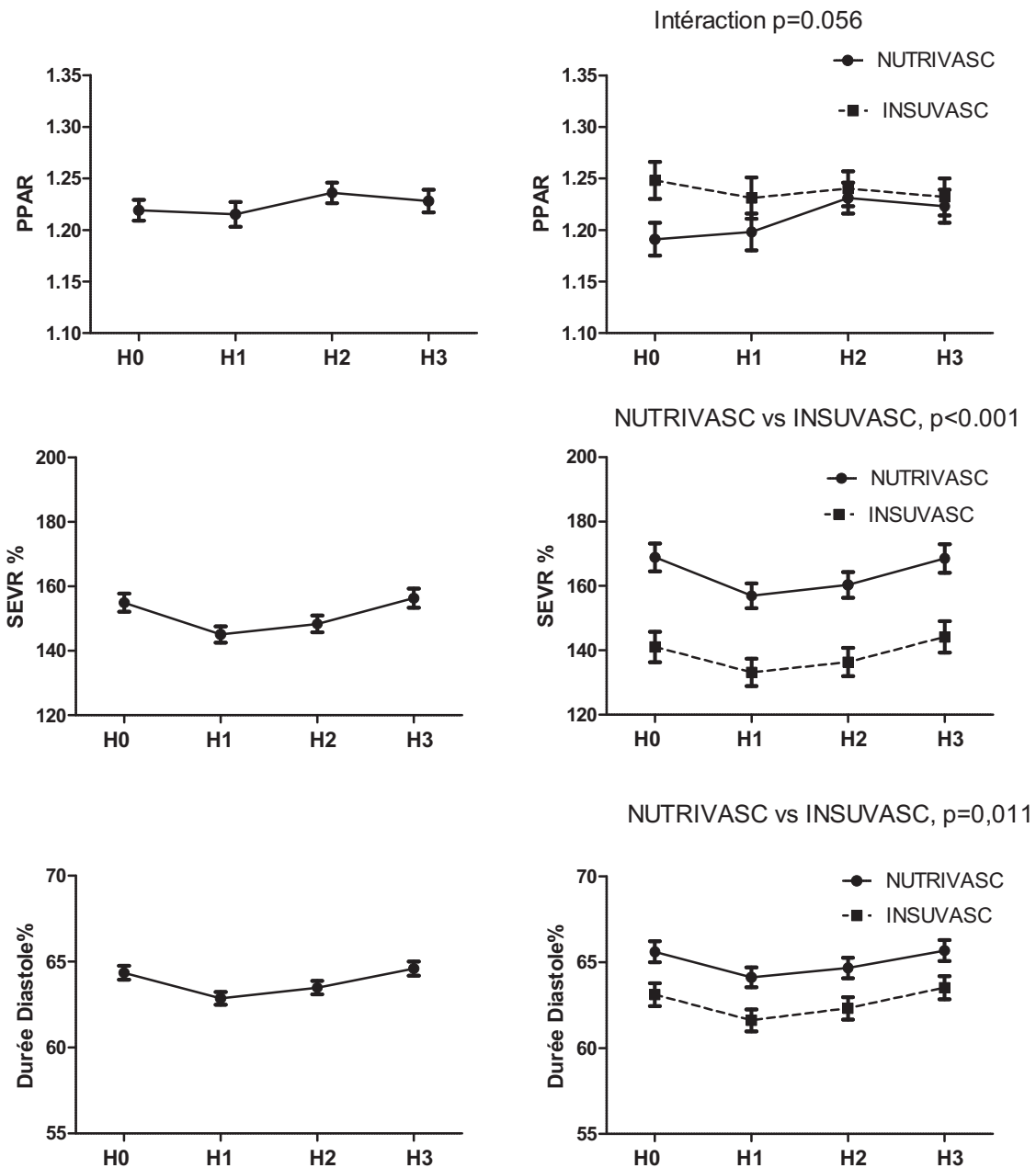


Figure 59: NUTRIVASC et INSUVASC. FC, Pressions systoliques et pulsées artérielles périphériques et centrales.

En post prandial les patients diabétiques avaient une FC, une pression systolique centrale et périphérique plus élevée. La PA centrale diminuait en post-prandial dans le groupe des sujets sains (Interaction  $p=0,031$ ).



**Figure 60: NUTRIVASC et INSUVASC Augmentation des pressions pulsées, indice de perfusion myocardique et durée de diastole**  
*Durée de diastole exprimée comme % du cycle cardiaque*

L'indice de perfusion myocardique SEVR et la durée de la diastole restaient plus élevés pour les sujets sains en post prandial.

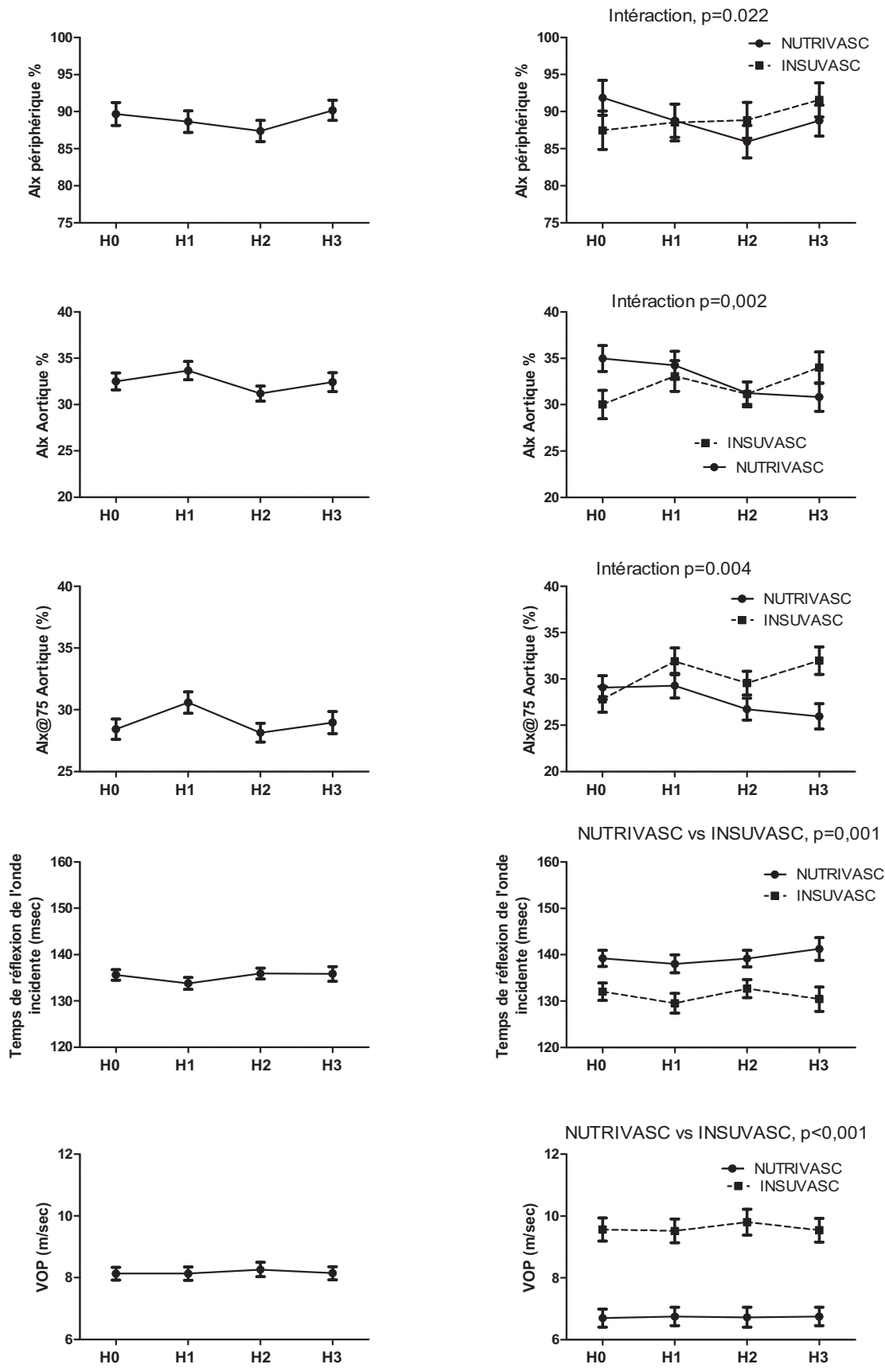


Figure 61: NUTRIVASC et INSUVASC :Index d'augmentation périphérique et centrale ajusté sur la FC, temps de réflexion de l'onde incidente et VOP

En post prandial l'index d'augmentation périphérique ou aortique continue à s'accroître chez les diabétiques même après un ajustement pour la FC à 75 bpm. La rigidité aortique reste plus basse dans le groupe des volontaires sains.

### 3.4.4.3 Fonction endothéliale (petites artères) et flux sanguin cutané

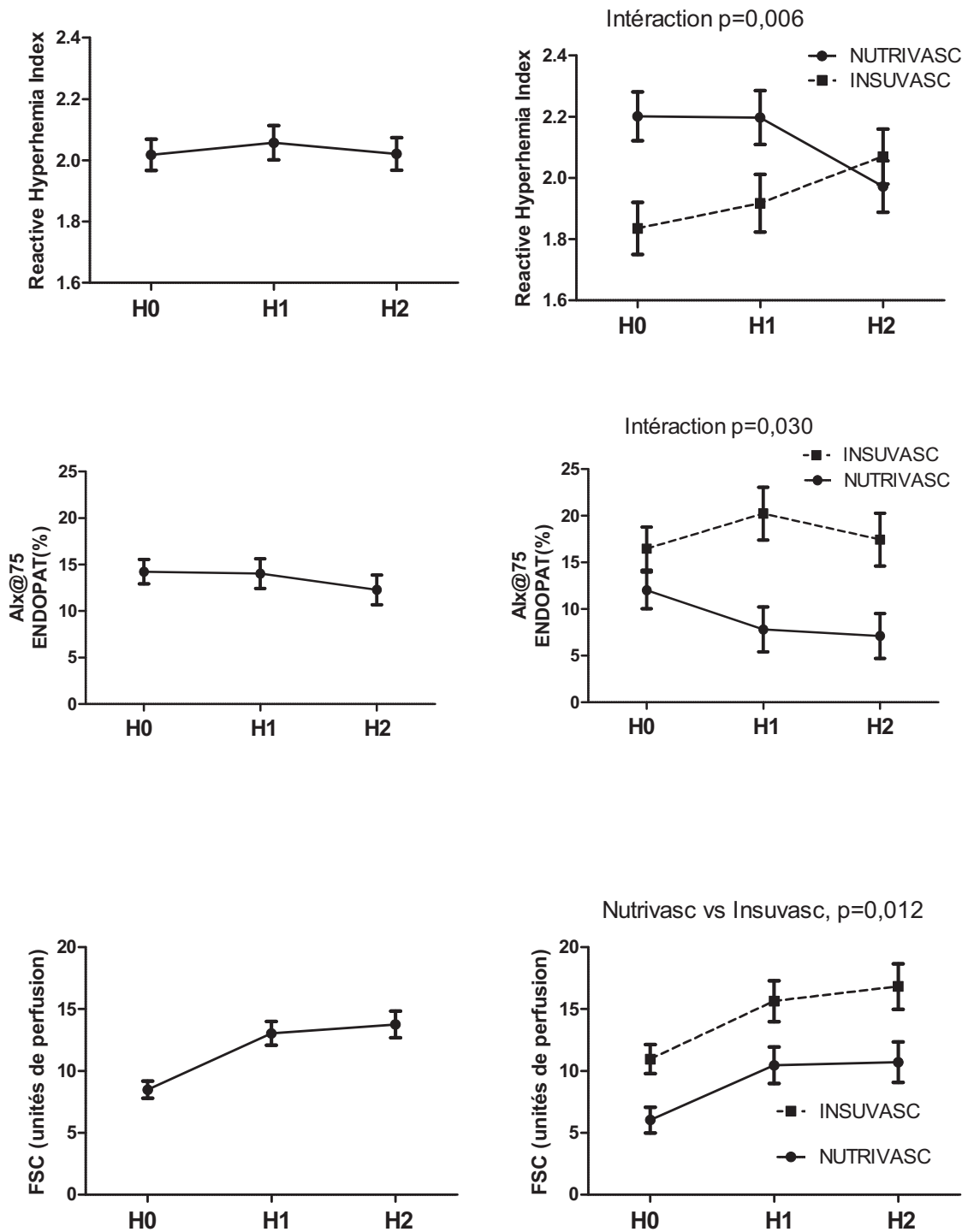
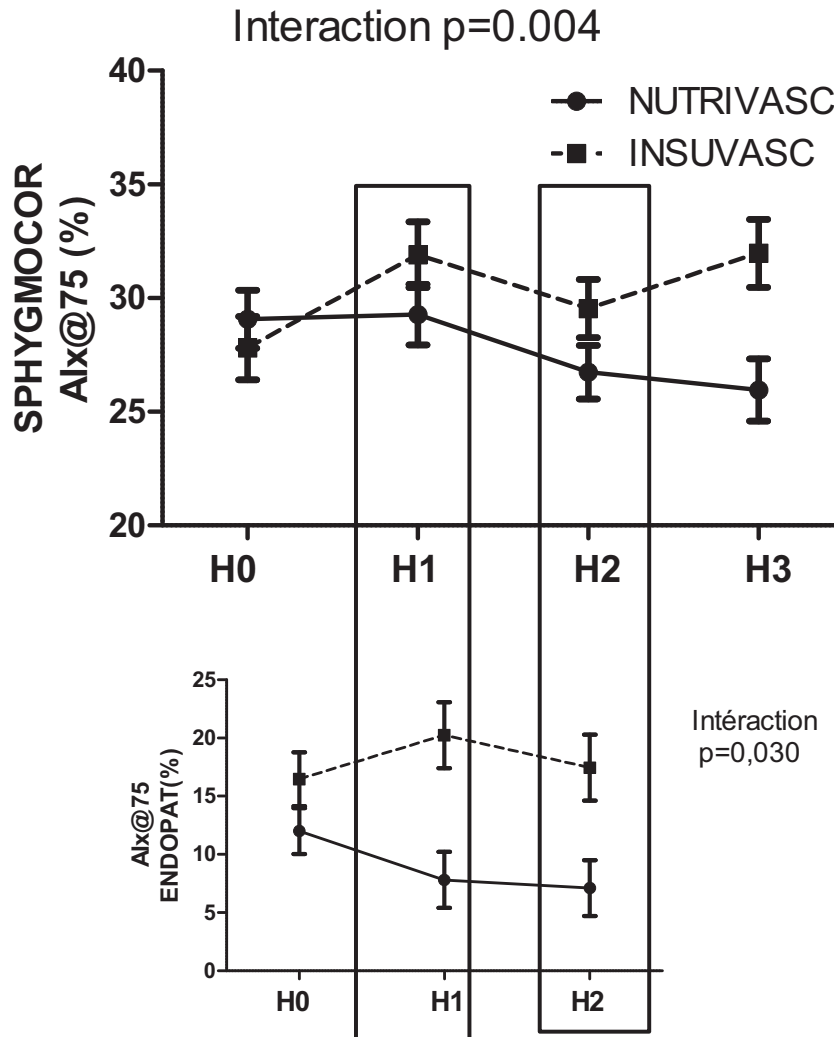


Figure 62: NUTRIVASC et INSUVASC. *Fonction endothéliale et FSC.*



En post prandial la réponse endothéliale et du FSC diffère chez les sujets âgés sains et chez les diabétiques la fonction endothéliale diminue à H2, ainsi que l'index d'augmentation chez les sujets sains. Par contre le flux sanguin cutané augmente comme chez les diabétiques.



**Figure 63 : NUTRIVASC et INSUVASC Représentation des résultats de l'index d'augmentation obtenus par Sphygmocor et avec l'ENDOPAT**

L'index d'augmentation obtenu par Sphygmocor (artère radiale) à H1 et H2 (image du haut) évolue de la même façon pour le même index obtenu avec l'ENDOPAT (artère digitale) avec 30 minutes de décalage dans la période. La même interaction est observée.

### 3.4.5 Conclusions

Dans l'étude NUTRIVASC la FC à jeun et pendant le période postprandial est plus basse qu'à l'étude INSUVASC alors que les sujets étaient plus âgés. Ce phénomène s'accompagne d'une diastole plus longue.

L'absence de facteurs de risque dans le groupe NUTRIVASC a ralenti le vieillissement vasculaire par rapport aux patients diabétiques malgré âge supérieur de 11 ans en moyen dans un tranche d'âge ou la VOP (PWV) suit une association non linéaire mais polynomiale avec l'âge [154].

Les sujets sains avaient une meilleure fonction endothéliale et un flux sanguin plus bas.

Les résultats principaux de notre étude concernent la période post prandiale durant la quelle il existe toujours une différence sur la FC. On retrouve les mêmes différences entre les 2 groupes pour les pressions systoliques et pulsées, périphériques et centrales. La réponse de la PAS aortique n'est pas la même car dans la groupe NUTRIVASC la pression artérielle s'abaisse contrairement au groupe INSUVASC ou elle augmente (interaction,  $p=0,031$ ).

Il existe une dissociation de la réponse post prandiale sur l'index d'augmentation en périphérie et au niveau aortique entre les 2 groupes; les patients diabétiques augmentent leur AIX à la fin du test et ce résultat persiste même après ajustement sur la fréquence cardiaque (AIX@75).

Les enregistrements avec l'ENDOPAT calculent aussi l'AIX@75 au niveau de l'artère digitale aux mêmes périodes du test (H0 à H2) avec un décalage de 30 minutes et montrent des résultats identiques avec une interaction significative pour la période H0 à H2 (**Figure 63**).

La fonction endothéliale en post prandial diffère aussi entre les 2 groupes mais à la fin du test (période H2) les RHI sont identiques. En ce qui concerne le FSC on a une augmentation en post prandiale avec le même type de réponse dans les 2 groupes.

## **3.5 Neuropathie et NAC effet sur la rigidité artérielle**

### **3.5.1 Introduction**

La relation entre les changements de la macro et microcirculation est difficile à démêler d'autant plus qu'ils partagent des liens communs avec l'hypertension.

L'hypertension est aussi considérée comme un facteur de risque de neuropathie périphérique chez les patients diabétiques [513]. L'association a été rapportée entre la neuropathie périphérique et la rigidité artérielle. Cette relation peut toutefois changer en fonction de la présence ou l'absence d'hypertension. La rigidité artérielle élevée chez les patients normotendus atteints de neuropathie périphérique indique probablement un risque accru d'événements cardio-vasculaires.

### **3.5.2 Objectif**

Le but de cette étude était d'examiner la relation, chez les patients diabétiques de type 2, entre la rigidité artérielle et la présence ou l'absence de neuropathie périphérique et l'hypertension considérées séparément, après exclusion des facteurs de confusion tels que l'âge.

### **3.5.3 Méthodes**

#### **3.5.3.1 Patients**

Les patients ont été recrutés de façon consécutive au cours de leur séjour dans le département de diabétologie de l'hôpital Jean Verdier (Bondy, France) entre Mars 2006 et Mars 2012. L'étude était en conformité avec la Déclaration d'Helsinki. Tous les patients inscrits dans cette étude ont donné leur consentement éclairé par voie orale en conformité avec les directives européennes. Les patients ont été inclus s'ils avaient un diagnostic de diabète de type 2 et s'ils n'avaient pas de maladie artérielle périphérique. Le diabète de type 1 ou diabète secondaire, avec acidocétose, une autre cause de la neuropathie, l'abus d'alcool, une hypertension secondaire, une hypo ou hyperthyroïdie constituaient des critères d'exclusion.

L'hypertension a été définie par la présence d'un traitement anti-hypertenseur ou d'une PA pendant la consultation supérieure à 140/90 mmHg. Le diagnostic de neuropathie périphérique (PN) a été effectué en conformité avec les critères internationaux récents définis par le consensus sur neuropathies périphérique [514]. Le diagnostic de PN a été posé sur la

présence de deux ou plusieurs des caractéristiques suivantes: symptômes neuropathiques (diminution de la sensation, engourdissement pendant le sommeil, picotements, sensations de brûlures ou une douleur lancinante, principalement dans les orteils, les pieds ou les jambes), diminution de la sensibilité distale (perception tactile, monofilament ou vibration) ou absence des réflexes achilléens. Les patients ont été groupés en fonction de la présence (PN +) ou absence (PN-) de neuropathie périphérique ou la présence (+ HT) ou l'absence (HT-) d'hypertension. La neuropathie autonome cardiaque (NAC) a été évaluée dans un sous-groupe de patients. La NAC a été diagnostiquée quand au moins un des trois tests de la variabilité de la FC était anormal (respiration profonde, orthostatisme actif, Valsalva) [514].

### **3.5.3.2 Mesure de la VOP**

La VOP (PWV) a été mesurée avec le dispositif SphygmoCor® (ATCOR, Sydney, Australie). En bref, la VOP a été mesurée comme la distance artérielle divisée par le temps de transit de l'onde sphymique de la carotide à l'artère fémorale.

La valeur de la VOP de patients a été comparée au 90<sup>ème</sup> percentile de la VOP selon l'âge et les catégories de la PA comme cela a été rapporté par le groupe de collaboration sur les "Valeurs de référence de la rigidité artérielle" [515]. Pour ce faire, chaque patient a été classé dans l'une des 5 catégories de la PA (optimale, normale, normale élevée, hypertension de classe I et classe II / III hypertension) et dans l'une des six catégories d'âge (< 30, 30-39, 40-49, 50-59, 60-69, ≥ 70 ans). La VOP de chaque patient était ensuite comparée à la référence qui correspondait à l'âge du 90<sup>e</sup> percentile et la VOP ajusté sur la PA. Si la VOP était plus élevée que la valeur de référence, le patient a été classé dans le groupe PWV +, sinon dans le groupe PWV-.

### **3.5.3.3 Mesure des pressions centrales**

La tonométrie radiale calibrée avec les pressions du brassard brachial a été utilisée pour estimer la pression centrale avec la fonction de transfert du système SphygmoCor. Le logiciel fournit également un index de qualité des enregistrements tonométriques; seules les mesures avec un index de l'opérateur au-dessus de 80 ont été utilisées dans l'étude. La pression pulsée périphérique (PPP) et la pression pulsée centrale (PPC) ont également été mesurées par la différence de la pression systolique moins la diastolique.

### **3.5.4 Résultats**

Par rapport aux patients sans PN (groupe PN-), les patients PN + étaient plus âgés, avaient une durée du diabète plus longue, et des taux d'HbA1c et de cholestérol total supérieurs. Ils étaient plus susceptibles d'être hypertendus (odds ratio 2,4 [95 % intervalle de confiance de 1.06 -3.07]), d'avoir une rétinopathie (OR 3,0 [2,0 - 4,5]) et une NAC (OR 2.3 [1.4 - 3.9]). Ils avaient une VOP, des pressions périphériques et centrales plus élevées que les patients PN.

La durée du diabète, le taux d'HbA1c et de cholestérol total, la rétinopathie, l'hypertension et la NAC ont été inclus dans un modèle d'analyse multivariée pour expliquer la PN (modèle 1). Le même modèle a été réalisé en utilisant l'âge au lieu de la durée du diabète (modèle 2). Dans les deux modèles, tous les paramètres, sauf les taux de cholestérol étaient indépendamment associés à PN.

Les patients du groupe PWV + et ceux du groupe PWV- étaient similaires en ce qui concerne l'âge, l'hypertension, PN et NAC. Cependant, ils avaient une plus longue durée de diabète, un taux d'HbA1c plus élevé et un risque plus haut de rétinopathie (OR 1,7 [1,1-2,5]).

Il y avait une interaction pour l'effet de l'hypertension et de PN sur le risque d'avoir une VOP élevée : le risque d'avoir une VOP supérieure à la valeur 90e percentile selon l'âge et la PA était plus élevé chez les patients HT-/PN+ patients. Aucune interaction n'a été trouvée pour d'autres paramètres, tels que l'obésité, la durée du diabète ou la NAC.

### **3.5.5 Discussion**

Nous avons montré qu'un tiers des patients diabétiques avaient une VOP élevée selon le critère d'une valeur au-dessus du 90e percentile des valeurs de référence de la VOP ajustées sur l'âge et les catégories de la pression systolique [515]. Ces résultats sont en accord avec les publications précédentes [516] et renforcent le rôle du diabète de type 2 dans l'accélération du vieillissement vasculaire.

L'obésité n'avait pas d'influence sur nos résultats. Parmi les patients normotendus, ceux avec PN étaient deux fois plus susceptibles d'avoir une valeur de VOP au dessus du 90ème percentile par rapport à ceux sans PN (53% vs 27 %). Parmi de patients normotendus avec PN le pourcentage de ceux ayant une VOP élevée était également plus élevé que parmi les patients hypertendus avec ou sans PN (53 % vs 33 % et 31%). Dans l'analyse de l'interaction avec PN et l'hypertension, aucune relation significative n'a été trouvée avec les autres facteurs de risque bien établis de la rigidité artérielle. L'influence protectrice sur la rigidité artérielle de

l'HTA chez les patients avec PN est surprenante et pourrait être due à l'utilisation de traitements anti-hypertenseurs.

Liatis et al ont trouvé une association entre la VOP et la neuropathie autonome cardiaque chez les patients diabétiques de type 1 [517]. Dans notre cohorte de diabétiques de type 2, la neuropathie autonome cardiaque a été correctement évaluée chez 65 % des patients. Dans ce sous-groupe, la prévalence de la NAC était plus élevée chez les patients atteints de PN ce qui n'est pas étonnant vu que ces deux complications partagent des facteurs physiopathologiques communs. Cependant, nous ne trouvons aucune association de la NAC avec la VOP. Des études plus spécifiques, avec évaluation de la NAC plus précise y compris par l'évaluation de l'activité vagale et sympathique, sont nécessaires afin d'analyser l'association entre la neuropathie cardiaque et la rigidité artérielle.

Nous avons étudié la prévalence de la rigidité artérielle élevée chez les patients atteints de diabète de type 2. Par rapport aux valeurs de référence en fonction de leur âge et de la PA, l'aorte des sujets hypertendus diabétiques n'était pas plus rigide que chez les diabétiques normotendus quels que soient leur statut PN ou l'état de la NAC. Bien que notre étude ne nous permette pas de le confirmer, cette constatation pourrait être due à l'effet bénéfique des traitements anti-hypertenseurs. Cependant, parmi les sujets normotendus, la présence d'une PN augmentait de 2 fois la probabilité d'avoir une valeur de VOP -dessus du 90e percentile.

Ces données suggèrent que les diabétiques de type 2 avec PN et forte rigidité artérielle selon les valeurs de référence pour âge et statut tensionnel devrait être prise en charge soigneusement pour réduire les risques des complications cardio-vasculaires. Les mécanismes liant PN à rigidité artérielle demandent des études complémentaires.



## Arterial stiffness is elevated in normotensive type 2 diabetic patients with peripheral neuropathy



Q. Chen<sup>a,b</sup>, S. Chiheb<sup>a</sup>, M. Fysekidis<sup>a</sup>, Y. Jaber<sup>a</sup>, M. Brahimi<sup>a</sup>, M.T. Nguyen<sup>a</sup>,  
S. Millasseau<sup>c</sup>, E. Cosson<sup>a,d</sup>, P. Valensi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, Jean Verdier Hospital, AP-HP, Paris-Nord University, CRNH-IdF, CNFD, Bondy, France

<sup>b</sup> Shanghai Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, China

<sup>c</sup> Pulse Wave Consulting, Sein, Lou la Fore, France

<sup>d</sup> UMR U1153 Inserm/UP125 Inra/Cnam/Univ Paris 13, Research Center in Epidemiology and Biostatistic Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France

Received 6 July 2014; received in revised form 10 June 2015; accepted 2 August 2015

Available online 12 August 2015

### KEYWORDS

Arterial stiffness;  
Pulse wave velocity;  
Type 2 diabetes;  
Peripheral neuropathy;  
Hypertension

**Abstract** *Background and aims:* Arterial stiffness, a measure of macrovascular damage predictive of poor cardio-vascular outcomes, is strongly related to age and hypertension (HT). In diabetic patients peripheral neuropathy (PN) has been found to be associated with increased arterial stiffness, which might be due to the concomitant presence of HT. The aim of this study was to examine in type-2 diabetic patients, the relationship between arterial stiffness and presence or absence of PN and HT separately.

*Methods and results:* Arterial stiffness was measured with the gold standard carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) in 447 type-2 diabetic subjects of whom 66% were hypertensive: 53% had PN, and 40% had both. Patients with PN were older, more often hypertensive and had higher PWV than those free of PN. Patients were separated according to the presence or absence of PN and HT. PWV values above the 90th percentile age- and blood pressure adjusted reference range (PWV+) were different across these groups ( $p < 0.005$ ) with the following respective prevalences: 27.2%, 53.4%, 33.3% and 30.6%. Only PWV+ was significantly associated with PN and hypertension in the interaction analysis.

*Conclusion:* Well controlled hypertensive patients did not have elevated arterial stiffness compared to normotensive patients. This might be due to anti-hypertensive treatment although our study design does not allow us to confirm it. A strong association between PN and arterial stiffness was only present in normotensive patients, suggesting that normotensive type 2 diabetic patients with PN and elevated arterial stiffness should be carefully managed to prevent future macrovascular complications.

© 2015 The Italian Society of Diabetology, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition, and the Department of Clinical Medicine and Surgery Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author. Service d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition, Avenue du 14 Juillet, Hôpital Jean Verdier, 93143 Bondy Cedex, France. Tel.: +33 148 02 65 96; fax: +33 148 02 63 56.

E-mail address: [paul.valensi@aphp.fr](mailto:paul.valensi@aphp.fr) (P. Valensi).

## Introduction

The presence of diabetes is related to multiple complications at micro and macrovascular levels which both increase dramatically cardiovascular risk. Arterial stiffness, a measure of macrovascular damage, is higher in type 2 diabetics than in non-diabetic patients indicating accelerated vascular aging [1–4]. Several methods are available to assess arterial stiffness and carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) is usually referred as the gold standard [5]. PWV is an independent predictor of cardiovascular and overall mortality above and beyond standard risk factors in the general population and in patients with various cardiovascular risk factors including diabetes [6–10]. While PWV is an independent risk factor, it is also strongly related to age and hypertension [4]. Elevated arterial stiffness has also been specifically related to diabetic retinopathy [11,12], diabetic nephropathy [13], peripheral neuropathy [14–18] and cardiac autonomic neuropathy [19,20]. However the cause and effect relationship between macro and micro-circulation changes is difficult to untangle especially as they share common link with hypertension. Hypertension is considered as a risk factor for peripheral neuropathy in diabetic patients [21] and the association between peripheral neuropathy and arterial stiffness might differ according to the presence or absence of hypertension. Elevated arterial stiffness in normotensive patients with peripheral neuropathy would indicate an increased risk of cardio-vascular events.

The aim of this study was to examine the relationship, in type 2 diabetic patients, between arterial stiffness and presence or absence of peripheral neuropathy and hypertension separately, after exclusion of confounding factors such as age.

## Methods

### Patients

Patients were recruited consecutively during their stay in the diabetology department of Jean Verdier Hospital (Bondy, France) between March 2006 and March 2012. The study was in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients enrolled in this study gave informed oral consent in accordance with the European directives. Patients were included if they had been diagnosed with type 2 diabetes and were free of peripheral arterial disease. Patients with type 1 diabetes or secondary diabetes, with keto-acidosis, other cause of neuropathy, alcohol abuse, secondary hypertension, hypo or hyperthyroidism were excluded.

Hypertension was defined as the presence of on-going anti-hypertensive treatment or office blood pressure (BP) greater than 140/90 mm Hg. Diagnosis of peripheral neuropathy (PN) was done in accordance with the recent international consensus defining criteria for probable peripheral neuropathy [22]. PN diagnosis was based on the presence of two or more of the following characteristics: neuropathic symptoms (decreased sensation, asleep numbness, prickling or stabbing burning or aching pain,

predominantly in the toes, feet, or legs), decreased distal sensation (tactile, monofilament or vibratory perception) or reduced or absent ankle reflexes. Patients were tagged depending on the presence (PN+) or absence (PN-) of peripheral neuropathy or the presence (HT+) or absence (HT-) of hypertension. Cardiac autonomic neuropathy (CAN) was assessed in a subgroup of patients. CAN was diagnosed when at least one of the 3 standard tests of heart rate variability was positive for CAN (deep-breathing, lying-to-standing, Valsalva) [22]. Tests were performed with patient free of any treatment able to modify heart rate for at least 24 h, and were interpreted according to age by comparison with a published series of control subjects, as previously described [23]. The presence of diabetic retinopathy was defined as present or absent according to the Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study severity scales. Nephropathy was defined by urinary albumin excretion rate  $>30$  mg/day on at least two assessments and/or creatinine clearance  $<60$  ml/min.

### Measure of PWV

PWV was measured with ECG gated pressure signals with the SphygmoCor device (AtCor, Sydney, Australia) as reported elsewhere [24]. Briefly, PWV was measured as the arterial distance divided by the transit time from the carotid to the femoral artery. The arterial distance was assessed from surface measurements subtracting the sternal notch-femoral distance to the carotid-sternal notch distance. Transit time was automatically calculated from the foot of carotid and femoral pulses measured successively by applanation tonometry using R-wave of an ECG as a timing reference. Only measurements with a beat to beat transit time standard deviation below 5% were considered of good quality and used in the study. The reproducibility of this method has been specifically tested in diabetic patients [24].

Patient's PWV value was compared to the 90th percentile of PWV according to age and EP categories as reported by "The reference values from the arterial stiffness collaboration group" [25]. To do so, each patient was classified in one of the 5 BP categories (optimal, normal, high normal, grade I hypertension, and grade II/III hypertension) and in one of the six age categories ( $<30$ , 30–39, 40–49, 50–59, 60–69,  $\geq 70$  years old). Patient PWV value was then compared with the corresponding 90th percentile age and BP adjusted PWV reference. If PWV was higher, the patient was classified in PWV+ group and in the PWV- group otherwise.

### Measure of central parameters

Radial tonometry calibrated to brachial cuff pressures was used to estimate central pressure with the built-in transfer function of the SphygmoCor system. The software also provides an operator index to check the quality of the tonometric recordings. Only measurements with an operator index above 80 were used in the study. Pulse wave analysis was performed on both radial and central waveforms. Peripheral pulse pressure (pPP) and central pulse



**Table 1** Patients' characteristics in the whole cohort and according to the absence (PN-) or presence (PN+) of peripheral neuropathy.

	Total	PN-	PN+	p
Number of patients	447	209	238	
Gender (men/women)	234/213	116/93	118/120	0.219
Age (years)	59 ± 11	56 ± 11	61 ± 10	< 0.05
Diabetes duration (years)	14 ± 9	9 ± 8	14 ± 9	< 0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.5 ± 5.7	30.1 ± 5.5	30.9 ± 5.8	0.131
Obesity (%)	224 (50%)	99 (47%)	125 (53%)	0.298
HbA1c (%)	7.8 ± 1.7	7.5 ± 1.6	8.0 ± 1.8	< 0.05
Active smoking (%)	59 (13%)	26 (12%)	33 (14%)	0.677
Total cholesterol (mmol/l)	4.6 ± 1.0	4.8 ± 1.1	4.5 ± 0.9	< 0.05
Triglycerides (mmol/l)	1.8 ± 2.0	2.0 ± 2.6	1.7 ± 1.4	0.101
HDL cholesterol (mmol/l)	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4	0.982
LDL cholesterol (mmol/l)	2.6 ± 1.1	2.7 ± 0.9	2.6 ± 1.2	0.119
Creatininemia (μmol/l)	85.7 ± 36.0	84.9 ± 27.0	86.3 ± 42.3	0.681
Retinopathy (%)	171 (38%)	52 (25%)	119 (50%)	< 0.05
Nephropathy (%)	150 (33%)	63 (30%)	87 (37%)	0.097
Cardiac autonomic neuropathy (%) <sup>a</sup>	197 (59%)	77 (59%)	120 (77%)	< 0.05
Hypertension (%)	297 (66%)	117 (56%)	180 (76%)	< 0.05
pSBP (mm Hg)	128 ± 18	126 ± 16	130 ± 19	< 0.05
pDBP (mm Hg)	72 ± 10	73 ± 11	72 ± 10	0.252
pPP (mm Hg)	56 ± 16	53 ± 14	58 ± 18	< 0.05
PWV (m/s)	11.1 ± 4.2	10.4 ± 3.7	11.7 ± 4.5	< 0.05
PWV+ (%)	150 (34%)	64 (31%)	86 (36%)	0.230
pAix (%)	79 ± 14	78 ± 14	80.1 ± 12.8	0.147
cAix (%)	24 ± 11	23 ± 11	25 ± 10	0.124
cPP (mm Hg)	42 ± 14	40 ± 12	44 ± 16	< 0.05

Data are n (%) or mean ± SD.

PN+: patient with diagnosed peripheral neuropathy.

PN-: patient with no diagnosis of peripheral neuropathy.

BMI: body mass index.

PWV: carotid-to-femoral pulse wave velocity.

PWV+: patient with PWV value higher than the 90 percentile of the reference range values according to their age and BP.

HT+: patient with diagnosed hypertension.

cPP: central pulse pressure.

pAix: Augmentation index measured at the radial artery.

cAix: central Augmentation index.

cPP: central pulse pressure.

<sup>a</sup> 287 patients were explored for cardiac autonomic neuropathy.

pressure (cPP) were also measured as systolic minus diastolic pressure. Peripheral augmentation index (pAix) and central augmentation index (cAix) were calculated by the SphygmoCor software: pAix was defined on the radial tracing as the pressure of the second systolic peak divided by the radial pulse pressure. cAix was calculated on the estimated central pressure as the difference between the first and second systolic peak divided by pulse pressure. Both pAix and cAix are composite parameters related to arterial stiffness but also to vascular tone. They can be interpreted as an integrate measure of overall vasculature.

### Biochemical measurements

The following measurements were performed: HbA1c (Dimension technology, Siemens Healthcare Diagnosis Inc., Newark, USA), serum total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides (enzymatic colorimetry, Hitachi 912, Roche Diagnostic, Meylan, France), creatininemia (colorimetry, Kone Optima, Thermolab System, Paris La Défense, France) and the 24 h urinary albumin excretion rate (laser

immunonephelometry EN100, Dade-Behring, Paris, France). LDL cholesterol was calculated using the Friedwald formula.

### Statistics

Data are expressed as means ± sd for continuous variables and in percentages for discrete variables. Differences between groups were assessed by ANOVA tests. For discrete variables, Chi-square test was used. Multivariate analyses to explain PN were performed using the parameters that were significantly associated with PN in univariate analyses. As age and diabetes duration are strongly related, two separate models for the multivariate analysis were used either with diabetes duration (model 1) or with age (model 2). General linear model for quantitative variables and logistic regression for qualitative variables were used for the analyses of hypertension effect, PN effect, and for the analyses of the interaction between hypertension and PN effect on PWV+ group. As age and blood pressure were used for the definition of PWV+, there were redundant

variables and hence not used for multivariate analysis on PWV+. Statistical analyses were performed with SPSS software (SPSS 11.5.0, Chicago, USA). P value smaller than 0.05 was considered as significant.

## Results

Of the 466 diabetic patients with good quality measurements, 19 patients were excluded from the study because they had type 1 diabetes. Characteristics of the remaining 447 patients are presented in Table 1: 238 patients (53%) had PN and 297 (66%) were hypertensive. As expected, in the whole population PWV was positively correlated with age, blood pressure, diabetes duration (Data in Supplement Table). There was a weak negative but however significant relationship between PWV and BMI in the whole population but it disappeared in subgroups analysis (Data in Supplement Table). PWV was above the 90th percentile of PWV according to age and BP categories in 34% of the whole cohort (PWV+ group). Cardiac autonomic neuropathy was assessed in a subgroup of 287 patients. Their characteristics did not differ from the whole population (data not shown).

Compared to patients without PN (PN- group), PN+ patients were older, had longer diabetes duration, higher HbA1c level and lower total cholesterol levels. They were more likely to suffer from hypertension (odds ratio 2.4 [95% confidence interval 1.6–3.7]), from retinopathy (OR 3.0 [2.0–4.5]) and CAN (OR 2.3 [1.4–3.9]). PN+ patients had also higher PWV, peripheral and central pressures than PN- patients.

Diabetes duration, HbA1c and total cholesterol levels, retinopathy, hypertension and CAN were entered in a multivariate analysis to explain PN (model 1). The same model was performed using age instead of diabetes

**Table 2** Parameters associated with peripheral neuropathy (multivariate analyses).

	Odds ratio	95% Confidence interval	p
<b>Model 1</b>			
Diabetes duration (per 10 years)	1.44	1.08–1.81	0.016
HbA1c (per %)	1.23	1.06–1.44	0.007
Total cholesterol (per mmol/l)			NS
Retinopathy	1.84	1.03–3.31	0.040
Cardiac autonomic neuropathy	1.84	1.03–3.31	0.033
Hypertension	1.84	1.07–3.17	0.027
<b>Model 2</b>			
Age (per 10 years)	1.32	1.05–1.60	0.018
HbA1c (per %)	1.23	1.05–1.44	0.012
Total cholesterol (per mmol/l)			NS
Retinopathy	2.21	1.28–3.84	0.005
Cardiac autonomic neuropathy	1.98	1.13–3.45	0.017
Hypertension	1.78	1.03–3.07	0.040

**Table 3** Patients' characteristics according to the absence (PWV-) or presence (PWV+) of elevated pulse wave velocity.

	PWV-	PWV+	p
Number of patients	297	150	
Gender (men/women)	150/147	84/66	0.316
Age (years)	59 ± 11	59 ± 11	0.956
Diabetes duration (years)	11 ± 9	13 ± 9	< 0.05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.8 ± 5.6	29.9 ± 5.8	0.106
Obesity (%)	157 (52%)	67 (45%)	0.110
HbA1c (%)	7.6 ± 1.6	8.1 ± 1.8	< 0.05
Active smoking (%)	41 (14%)	18 (12%)	0.659
Total cholesterol (mmol/l)	4.6 ± 1.0	4.6 ± 1.0	0.858
Triglycerides (mmol/l)	1.8 ± 2.0	1.9 ± 2.1	0.618
HDL cholesterol (mmol/l)	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.3	0.352
LDL cholesterol (mmol/l)	2.7 ± 1.1	2.6 ± 0.8	0.541
Creatininemia (μmol/l)	85.3 ± 36.8	86.5 ± 34.4	0.736
Retinopathy (%)	101 (34%)	70 (47%)	< 0.05
Nephropathy (%)	103 (35%)	47 (31%)	0.660
Peripheral neuropathy (%)	152 (51%)	86 (57%)	0.230
Cardiac autonomic neuropathy (%) <sup>a</sup>	126 (68%)	71 (70%)	0.691
Hypertension (%)	103 (51%)	94 (63%)	0.244
pSBP (mm Hg)	127 ± 18	129 ± 19	0.248
pDBP (mm Hg)	72 ± 11	73 ± 10	0.693
pPP (mm Hg)	55 ± 16	57 ± 18	0.311
PWV (m/s)	9.3 ± 2.5	14.7 ± 4.6	< 0.05
pAIx (%)	80 ± 14	79 ± 13	0.642
cAIx (%)	25 ± 11	22 ± 10	< 0.05
cPP (mm Hg)	42 ± 14	42 ± 15	0.940

PN+: patient with diagnosed peripheral neuropathy.

PWV: carotid-to-femoral pulse wave velocity.

PWV+: patient with PWV value higher than the 90 percentile of the reference range values according to their age and BP.

HT+: patient with diagnosed hypertension.

cPP: central pulse pressure.

pAIx: Augmentation index measured at the radial artery.

cAIx: central Augmentation index.

<sup>a</sup> 287 patients were explored for cardiac autonomic neuropathy.

duration (model 2). In both models, all the parameters but cholesterol levels were independently associated with PN (Table 2).

Patients in the PWV+ group and PWV- group were similar regarding their age, hypertension, PN and CAN. However they tended to have a longer diabetes duration, higher HbA1c and more risk to suffer from retinopathy (OR 1.7 [1.1–2.5]) (Table 3). In a model including gender, smoking, hypertension, diabetes duration, BMI, HbA1c, creatinine levels, PN and PN\*HT interaction, HbA1c (OR 1.15 [1.02–1.30], p = 0.018), PN (OR 2.80 [1.37–5.71], p = 0.005) and PN\*HT interaction (OR 0.26 [0.11–0.63], p = 0.003) were independent predictors of PWV+.

Table 4 shows our cohort classified depending on the presence (PN+) or absence (PN-) of PN and the presence (HT+) or absence (HT-) of hypertension. Age, diabetes duration, systolic BP, BMI, obesity, HbA1c, presence of CAN, and PWV were different across groups (global ANOVA). Despite good BP control with anti-hypertensive treatment, HT+ patients had nevertheless higher BP. Results of logistical regressions about the effect of hypertension, PN and their interaction are also shown on Table 4. There was

**Table 4** Patients' characteristics according to presence or absence of hypertension and peripheral neuropathy.

	HT-/PN-	HT-/PN+	HT+/PN-	HT+/PN+	<i>p</i> <sup>a</sup>	HT effect	PN effect	Inter action
Number of patients	92	58	117	180				
Gender (men/women)	48/44	29/29	68/49	89/91	0.512	–	–	–
Age (years)	53 ± 12	56 ± 11	59 ± 9	63 ± 9	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.430
Diabetes duration (years)	7 ± 7	12 ± 9	10 ± 9	15 ± 9	<0.0001	0.001	<0.001	0.848
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29.4 ± 5.7	25.7 ± 5.7	30.6 ± 4.9	31.3 ± 5.8	0.045	0.017	0.417	0.708
Obesity (%)	35 (38%)	23 (40%)	64 (54.7)	102 (57%)	0.007	0.017	0.844	0.977
HbA1c (%)	7.6 ± 1.6	8.0 ± 1.5	7.4 ± 1.6	8.1 ± 1.8	0.006	0.716	0.003	0.429
Active smoking (%)	13 (14%)	13 (22%)	13 (11%)	20 (11%)	0.139	–	–	–
pSBP (mm Hg)	123 ± 12	121 ± 11	133 ± 17	131 ± 15	<0.0001	<0.001	0.271	0.947
pDBP (mm Hg)	73 ± 11	69 ± 9	73 ± 11	73 ± 10	0.108	–	–	–
pPP (mm Hg)	47 ± 12	52 ± 11	58 ± 14	60 ± 19	<0.0001	<0.0001	0.026	0.349
cPP (mm Hg)	35 ± 11	36 ± 9	43 ± 12	46 ± 17	<0.0001	<0.0001	0.036	0.952
CAN (%) <sup>b</sup>	38 (60%)	25 (66%)	39 (57%)	91 (81%)	0.002	0.731	0.557	0.082
PWV+ (%)	25 (27%)	31 (53%)	39 (33%)	55 (31%)	0.005	0.338	0.001	0.004

BP: blood pressure.

HT: hypertension.

PN: peripheral neuropathy.

pSBP: peripheral systolic blood pressure.

pDBP: peripheral diastolic blood pressure.

pPP: peripheral pulse pressure.

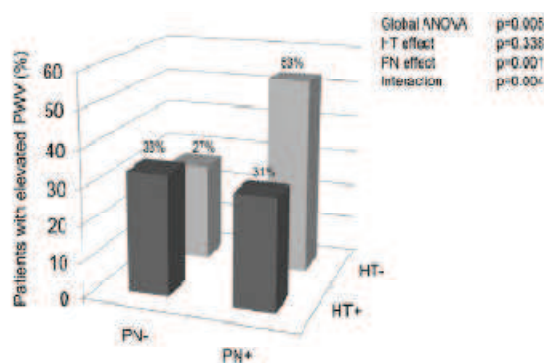
cPP: central pulse pressure.

BMI: body mass index.

CAN: cardiac autonomic neuropathy.

PWV: pulse wave velocity.

PWV+: PWV greater than the 90th percentile of age- and BP-adjusted PWV reference.

<sup>a</sup> Global ANOVA.<sup>b</sup> 287 patients were explored.**Figure 1** Percentage of patients with elevated arterial stiffness according to the presence of hypertension and neuropathy. Elevated pulse wave velocity (PWV) is defined as PWV value above the 90th percentile of the age and blood pressure adjusted PWV reference.

an interaction for the effect of hypertension and PN only for elevated PWV: the risk of having PWV above the 90th percentile of the age and BP reference range was higher in HT-/PN+ patients (Table 4 and Fig. 1). No interaction was found for other parameters, such as obesity, diabetes duration or CAN.

Most of the hypertensive patients were treated with several anti-hypertensive drugs: 214 patients (73%, 77% and 65% in the whole hypertensive group, in HT+/PN+ and in HT+/PN-, respectively, *p* = NS) were treated with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors, 111 with calcium antagonists (38%, 40%, 33%, *p* = NS), 105 with beta-blockers (36%, 36%, 35%, *p* = NS), 139 with a diuretic or a central acting drug (47%, 52%, 39%, *p* = NS).

## Discussion

Type 2 diabetes is associated with an increase of arterial stiffness independently of age and blood pressure level. Using a strict method comparing PWV to reference values, we showed that one third of the diabetic patients had elevated PWV as defined by a value above the 90th percentile of PWV reference values according to age and BP categories [25]. These results are in agreement with previous publications [1–4] and strengthen the role of type 2 diabetes in accelerating vascular aging. The process of this vascular aging is not fully understood and is likely to be multifactorial, each factor contributing independently or in conjunction to additional stiffening. Chronic hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, inflammation as well as endothelial dysfunction and increased amount of advanced glycation end-products are among the list of culprits [26]. They act on the vascular smooth muscle function or on the structure of the arterial wall disrupting the elastin/collagen matrix [27]. The most interesting result of the present study is that normotensive type 2 diabetic patients with PN had a higher likelihood of elevated PWV.

Obesity is a common confounder of both diabetes and hypertension. Intuitively one would think that obesity, being related to higher cardiovascular risk would be positively related to elevated arterial stiffness. However the literature shows conflicting data [28–32]. In their review about risk factors associated with PWV, Cecelja et al. found that only 13% of the relevant publications reported a positive association between BMI and PWV [4]. Several

authors reported a negative association [33,34] or no association [30–32]. Indeed overestimation of the arterial path length or clinical confounders of obesity could skew results. In a large cohort where these issues distances measurement techniques were assessed, Desamericq et al. did not find any relationship between weight status and PWV [32]. Our data were obtained with surface measurement and found a weak negative relationship. In the interaction analysis, BMI did not interact with PN and blood pressure and despite the lowest prevalence of obesity, normotensive patients with PN had the highest proportion of FWV above the 90th percentile.

Hypertension has been shown to be a risk factor for PN in type 1 and type 2 diabetic patients [21,35]. Similarly, in our population of type 2 diabetic patients, PN was associated with hypertension. PN has also previously been reported to be associated with elevated arterial stiffening [14–18]. In a previous work, we looked at total arterial compliance – the opposite of stiffness – in type 2 diabetic patients over 50 years of age [17]. PN was associated with low total arterial compliance, independently of classical cardiovascular risk factors including hypertension and independently of the presence or absence of silent myocardial ischemia, and also to a lesser extent with higher pulse pressure. However in this study, unlike the present one, we did not use the gold standard methodology for large artery stiffness: carotid-femoral PWV. What is more, differentiation between normotensive, hypertensive with or without PN was not studied. In a cross-sectional study of primary care patients over 65 years of age, Cho et al. reported, like in our study, that pulse pressure – a surrogate approximation of stiffness – was positively associated with the presence of PN in diabetes [35]. Similar results were also found when using brachial-ankle PWV [16,17,19]. However, brachial-ankle PWV is a composite measure of aortic and lower limb stiffness which can be influenced by peripheral arterial diseases. In our study we used carotid-femoral PWV, which is considered as the gold standard for arterial stiffness measurement, and none of the patients had peripheral arterial disease.

Cardoso et al. observed that patients with peripheral neuropathy had an 80% higher likelihood of having also elevated PWV [14]. However they defined elevated arterial stiffness as being above a 12 m/s threshold and did not adapt their threshold to age and blood pressure. As age and pressure are the main determinants of arterial stiffness [4], it is important to define elevated PWV according to these parameters [25]. In the present study we strictly considered elevated aortic PWV by comparing aortic PWV values with age and BP adapted reference range.

Among normotensive patients, those with PN were twice more likely to have PWV value above the 90th percentile compared to those without PN (53% vs 27%, Table 4 and Fig. 1). The percentage of normotensive patients with PN with elevated PWV was also higher than in hypertensive patients with or without PN (53% vs 33% and 31%, Table 4 and Fig. 1). In the interaction analysis with PN and hypertension, no significant relationship was found

with any of the other well-established risk factors for arterial stiffness (Table 4). The apparent protective influence of hypertension against arterial stiffening in patients with PN is surprising and might be due to the use of antihypertensive treatments. Overall, blood pressure of our hypertensive patients was well controlled and several studies have shown that long term antihypertensive treatments have some beneficial effects on arterial stiffness beyond blood pressure lowering [37–41]. These studies also found that renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors might be the most effective to positively act on arterial remodeling and stiffness [41–43]. In our data, it was not possible to test for the effect of one anti-hypertensive class above another because this is an observational non-randomized study with treatment guided by standard clinical practice. We even observed that hypertensive subjects under renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors treatment were more likely to have PWV above the 90th percentile than patients not receiving it (data not shown). This observation cannot conclude on the potential effect of treatment but points towards a higher clinical use of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in patients with more diabetic complications.

The cause and effect relationship between arterial stiffness and PN is not clear. PWV was above the 90th threshold in about one in four normotensive patients without PN. This indicates that arterial stiffening can happen before the onset of hypertension and PN and hence might contribute to impair nerve function. Because of the loss of the buffering effect, arterial stiffening alone or in conjunction with hypertension could lead to increased pulsatility and shear stress in small vessels which in turn might reduce nerve conduction activity [44,45]. Conversely peripheral neuropathy could aggravate arterial stiffening as suggested by the higher proportion of normotensive patients with PN who also had elevated PWV (53%). Kaess et al. [46] recently showed in the Framingham longitudinal community cohort that elevated PWV in normotensive subjects was associated with higher risk of incident hypertension. Kaess' study was performed with the gold standard carotid-femoral PWV and confirms previous ones using other methods [47–50]. It highlights that increased aortic stiffness could potentially lead to hypertension. In normotensive diabetic patients, PN might contribute to alter arterial stiffness and peripheral resistance by promoting medial arterial calcification, altering vessel tone and vasomotion [18,51] and might lead later to hypertension. A longitudinal follow-up of these patients is required to evaluate the pathophysiological progression of the damage to macro and microvasculature.

Another underlying factor between hypertension and PN could also reside in some alteration in cardiac autonomic nervous system. Liatis et al. found an association between PWV and cardiac autonomic neuropathy in type 1 diabetic patients [52]. In our type 2 diabetic cohort, cardiac autonomic neuropathy was properly evaluated in only 65% of the patients. In this subgroup, the prevalence of CAN was higher in patients with PN which is not surprising as

these both complications share common pathophysiological factors. However, we did not find any association of CAN with aortic stiffness PWV (Tables 3 and 4). More specific studies, with more precise CAN assessment and description including more specific assessment of vagal and sympathetic activity, are required to analyze the association between cardiac neuropathy and large and small artery stiffness.

Diabetic patients might enter a vicious circle cycle where one disorder could cause another one which in turn sustains the first one. Neuropathic damage could lead to arterial stiffening and hypertension and vice versa. While our observational data does not allow us to demonstrate this circular relationship, it however emphasizes the importance of careful management of diabetic patients with PN to prevent the onset of hypertension and its associated cardiovascular complications. Malik et al. investigated the effect of ACE inhibition in normotensive patients with mild diabetic neuropathy. In a randomized double-blind placebo-controlled study, they showed thattrandolapril may improve peripheral nerve conduction [53]. Whether the blockade of the renin angiotensin system might improve nerve conduction in normotensive diabetic patients with PN by reducing arterial stiffness and whether it could prevent incident hypertension, deserve being tested in further studies.

Our study has some limitations. This was a cross-sectional observational study, and so the association between arterial stiffness and PN could only be observed but cannot be mechanistically explained. Our cohort was recruited from patients referred to our diabetology department. They were likely to have more complications than the general diabetic population. Patient treatment was guided through standard medical practice, preventing us to be able to study specific drug effects on arterial stiffness. We did not assess patient's physical activity which could be related to arterial stiffness status [54]. However a high proportion of our patients had diabetes with multiple complications and the majority of them were sedentary with very limited physical activity. We used the reference ranges for PWV which have been established from 11 092 patients with and without cardiovascular risk but who were not diabetic and no under antihypertensive or lipid treatment [25]. One could argue that this reference range is hence not applicable to a diabetic population. However the objective of reference range values is to have a tool to compare PWV to a general population. This does not contradict the fact that diabetic patients have higher stiffness than individuals without diabetes. We chose to use the 50th percentile in order to compare diabetic patients with or without PN. This cut-off is rather high and provides further evidence that the presence of PN is associated with accelerated arterial stiffening above what is expected from diabetes alone. Finally PN was only assessed by using a diagnostic criterion for a probable PN according to the recent international Toronto consensus [22]. Our patients were recruited during the routine clinical care of a diabetology department and it was not possible to perform more rigorous

assessments such as specific electrophysiological measurements. The present findings should be confirmed with more stringent measurements of nerve function including conduction velocities and specific evaluation of small fiber neuropathy.

We studied the prevalence of elevated arterial stiffness in patients with type 2 diabetes. Compared to reference range according to their age and blood pressure level, the aorta of diabetic hypertensive subjects was not stiffer than diabetic normotensives whatever was the PN status or the CAN status. While our study does not allow us to confirm it, this finding might be due to the beneficial effect of anti-hypertensive treatments. However among normotensive subjects, the presence of PN increased by 2 fold the likelihood of having a PWV value above the 90th percentile. Further studies are required to elucidate the cause and effect relationship between PN and arterial stiffness. Finally normotensive type 2 diabetic patients with PN and elevated arterial stiffness should be carefully managed to prevent the onset of future macrovascular complications.

#### Author contributions

QC collected data. SC collected data. MF contributed to discussion. YJ collected the data. MTN collected data. SM wrote the manuscript. EC contributed to the discussion. PV directed the research and wrote the manuscript.

#### Conflict of interest

Sandrine Millasseau works as a freelance specialist on pulse wave analysis and receives revenues from several medical device companies including Alam Medical whose device was used in this study.

The other authors declare having no conflict of interest in relation with this paper.

#### Acknowledgments

Paul Valensi is the guarantor of the study

Qinda Chen is grateful to Servier Company for the grant he received to take an active part in this study. Doctor Sara Finto helped us to collect information regarding antihypertensive treatments used in the study population.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2015.08.001>.

#### References

- [1] Tanigaki H, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Kanda H, Maekawa K, et al. Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. *Vessel wall properties in type 2 diabetes*. *Diabetes Care* 1999;22:1851–7.
- [2] Schram MT, Henry RM, van Dijk RA, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, et al. Increased central artery stiffness in impaired

- glucose metabolism and type 2 diabetes: the Hoorn study. *Hypertension* 2004;43:176–81.
- [3] De Angelis L, Millasseau SC, Smith A, Viberti G, Jones RH, Ritter JM, et al. Sex differences in age-related stiffening of the aorta in subjects with type 2 diabetes. *Hypertension* 2004;44:67–71.
  - [4] Ceceļja M, Chowienzyk P. Dissociation of aortic pulse wave velocity with risk factors for cardiovascular disease other than hypertension: a systematic review. *Hypertension* 2009;54:1328–36.
  - [5] Laurent S, Cockcroft J, Van BL, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006;27:2588–605.
  - [6] Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, Gosling RG. Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation* 2002;106:2085–90.
  - [7] Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1318–27.
  - [8] Cardoso CR, Ferreira MT, Leite NC, Salles GF. Prognostic impact of aortic stiffness in high-risk type 2 diabetic patients: the Rio de Janeiro Type 2 Diabetes Cohort Study. *Diabetes Care* 2013;36:3372–8.
  - [9] Mansour AS, Yannoutsos A, Majahalmeh N, Agnoletti D, Safar ME, Ouerdane S, et al. Aortic stiffness and cardiovascular risk in type 2 diabetes. *J Hypertens* 2013;31:1584–92.
  - [10] Ben-Shlomo Y, Spears M, Boustred C, May M, Anderson SG, Benjamin EJ, et al. Aortic pulse wave velocity improves cardiovascular event prediction: an individual participant meta-analysis of prospective observational data from 17,635 subjects. *J Am Coll Cardiol* 2013;63:636–46.
  - [11] Rema M, Mohan V, Deepa R, Ravikumar R. Association of carotid intima-media thickness and arterial stiffness with diabetic retinopathy: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-2). *Diabetes Care* 2004;27:1962–7.
  - [12] Garcia-Ortiz L, Ramos-Delgado E, Recio-Rodriguez JJ, Agudo-Conde C, Martinez-Salgado C, Patino-Alonso MC, et al. Peripheral and central arterial pressure and its relationship to vascular target organ damage in carotid artery, retina and arterial stiffness. Development and validation of a tool. *The Vaso risk study. BMC Public Health* 2011;11:266.
  - [13] Smith A, Karalliedde J, De AL, Goldsmith D, Viberti G. Aortic pulse wave velocity and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1069–75.
  - [14] Cardoso CR, Ferreira MT, Leite NC, Barros PN, Conte PH, Salles GF. Microvascular degenerative complications are associated with increased aortic stiffness in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2009;205:472–6.
  - [15] Yokoyama H, Yokota Y, Tada J, Kanno S. Diabetic neuropathy is closely associated with arterial stiffening and thickness in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2007;24:1329–35.
  - [16] Kim ES, Moon SD, Kim HS, Lim DJ, Cho JH, Kwon HS, et al. Diabetic peripheral neuropathy is associated with increased arterial stiffness without changes in carotid intima-media thickness in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:1403–5.
  - [17] Nguyen MT, Pham I, Chemla D, Valensi P, Cosson E. Decreased stroke volume-brachial pulse pressure ratio in patients with type 2 diabetes over 50 years: the role of peripheral neuropathy. *Nutr Metab Cardiovasc* 2013;23:1093–100.
  - [18] Suh BC, Chung PW, Moon HS, Kim YB, Yoon WT, Shim DS, et al. Association between pulse wave velocity and nerve conduction study in diabetic patients. *Eur Neurol* 2010;64:219–23.
  - [19] Tentolouris N, Liatis S, Moysakis I, Tsapogas P, Psallas M, Diakoumopoulou E, et al. Aortic distensibility is reduced in subjects with type 2 diabetes and cardiac autonomic neuropathy. *Eur J Clin Invest* 2003;33:1075–83.
  - [20] Meyer C, Milat F, McGrath BP, Cameron J, Kotsopoulos D, Teede HJ. Vascular dysfunction and autonomic neuropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 2004;21:746–51.
  - [21] Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tingoviste C, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 2005;352:341–50.
  - [22] Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010;33:2285–93.
  - [23] Valensi P, Parès J, Attali JR, Cathelineau G, Fossati P, Verier-Mine O, et al. Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications – the French multicenter study. *Metabolism* 2003;52:815–20.
  - [24] Laugesen E, Rossen NB, Høyem P, Christiansen JS, Knudsen ST, Hansen KW, et al. Reproducibility of pulse wave analysis and pulse wave velocity in patients with type 2 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 2013;73:428–35.
  - [25] Arterial Stiffness Collaboration Group. Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: “establishing normal and reference values”. *Eur Heart J* 2010;31:2338–50.
  - [26] Bruno RM, Penno G, Daniele G, Pucci L, Lucchesi D, Stea F, et al. Type 2 diabetes mellitus worsens arterial stiffness in hypertensive patients through endothelial dysfunction. *Diabetologia* 2012;55:1847–55.
  - [27] Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008;51:527–39.
  - [28] Dahlen EM, Bjamegard N, Lanne T, Nystrom FH, Ostgren CJ. Sagittal abdominal diameter is a more independent measure compared with waist circumference to predict arterial stiffness in subjects with type 2 diabetes—a prospective observational cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:55.
  - [29] Scuteri A, Orrù M, Morrell CH, Tarasov K, Schlessinger D, Uda M, et al. Associations of large artery structure and function with adiposity: effects of age, gender, and hypertension. *The Sardinia Study. Atherosclerosis* 2012;221:189–97.
  - [30] Nordstrand N, Gjevestad E, Dinh KN, Hofso D, Roislien J, Saltvedt E, et al. The relationship between various measures of obesity and arterial stiffness in morbidly obese patients. *BMC Cardiovasc Disord* 2011;11:7.
  - [31] Kappus RM, Fahs CA, Smith D, Horn GP, Agiovlasis S, Rossow L, et al. Obesity and overweight associated with increased carotid diameter and decreased arterial function in young otherwise healthy men. *Am J Hypertens* 2013;27:628–34.
  - [32] Desamericq G, Tissot CM, Akakpo S, Tropeano AI, Millasseau S, Macquin-Mavier I. Carotid-femoral pulse wave velocity is not increased in obesity. *Am J Hypertens* 2014;28:546–51.
  - [33] Corden B, Keenan NG, de Marvao AS, Dawes TJ, Deceare A, Diamond T, et al. Body fat is associated with reduced aortic stiffness until middle age. *Hypertension* 2013;61:1322–7.
  - [34] Rodrigues SL, Baldo MP, Lani L, Nogueira L, Mill JG, Sa Cunha RD. Body mass index is not independently associated with increased aortic stiffness in a Brazilian population. *Am J Hypertens* 2012;25:1064–1069.
  - [35] Rosenson RS, Foretto P, Dodson PM. Does microvascular disease predict macrovascular events in type 2 diabetes? *Atherosclerosis* 2011;218:13–8.
  - [36] Cho DY, Mold JW, Roberts M. Further investigation of the negative association between hypertension and peripheral neuropathy in the elderly: an Oklahoma Physicians Resource/Research Network (OKPRN) Study. *J Am Board Fam Med* 2006;19:240–50.
  - [37] Ait-Oufella H, Collin C, Bozec E, Laloux B, Ong KT, Dufouil C, et al. Long-term reduction in aortic stiffness: a 5.3-year follow-up in routine clinical practice. *J Hypertens* 2010;28:2336–41.
  - [38] London GM, Asmar RG, O'Rourke MF, Safar ME. Mechanism(s) of selective systolic blood pressure reduction after a low-dose combination of perindopril/indapamide in hypertensive subjects: comparison with atenolol. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:92–9.
  - [39] Bellido CA, Iavicoli OR, Rusak EJ, Vazquez ST, Pineiro DJ, Lerman J. Continuous improvement of arterial compliance beyond blood pressure decrease after 5 years of antihypertensive treatment. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006;8:555–60.
  - [40] Ong KT, Delemer S, Pannier B, Safar ME, Benetos A, Laurent S, et al. Aortic stiffness is reduced beyond blood pressure lowering by short-term and long-term antihypertensive treatment: a meta-analysis of individual data in 294 patients. *J Hypertens* 2011;29:1034–42.

- [41] Boutouyrie P, Lacolley P, Briet M, Regnault V, Stanton A, Laurent S, et al. Pharmacological modulation of arterial stiffness: Drugs 2011;71:1689–701.
- [42] Laurent S, Boutouyrie P. Dose-dependent arterial stiffening and inward remodeling after amlésartan in hypertensives with metabolic syndrome. *Hypertension* 2014;64:709–16.
- [43] Boutouyrie P, Beausnier H, Al-Jouba A, Laurent S. Destiffening effect of valsartan and atenolol: influence of heart rate and blood pressure. *J Hypertens* 2014;32:108–14.
- [44] Mitchell GF, Vita JA, Larson MG, Parise H, Keyes MJ, Warner E, et al. Cross-sectional relations of peripheral microvascular function, cardiovascular disease risk factors, and aortic stiffness: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005;112:3722–8.
- [45] Yannoutsos A, Levy EI, Safar ME, Slama G, Blacher J. Pathophysiology of hypertension: interactions between macro and microvascular alterations through endothelial dysfunction. *J Hypertens* 2014;32:216–24.
- [46] Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, et al. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *J Am Med Assoc* 2012;308:875–81.
- [47] Liao D, Arnett DK, Tyroler HA, Foley WA, Chambless LE, Szklo M, et al. Arterial stiffness and the development of hypertension. The ARIC study. *Hypertension* 1999;34:201–6.
- [48] Najjar SS, Scuteri A, Shetty V, Wright JC, Muller DC, Fleg JL, et al. Pulse wave velocity is an independent predictor of the longitudinal increase in systolic blood pressure and of incident hypertension in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1377–83.
- [49] Demellis J, Pararetou M. Aortic stiffness is an independent predictor of progression to hypertension in nonhypertensive subjects. *Hypertension* 2005;45:426–31.
- [50] Takese H, Dohi Y, Toriyama T, Okada T, Tanaka S, Sonoda H, et al. Brachial-ankle pulse wave velocity predicts increase in blood pressure and onset of hypertension. *Am J Hypertens* 2011;24:667–73.
- [51] Jeffcoate WJ, Rasmussen LM, Hofbauer LC, Game FL. Medial arterial calcification in diabetes and its relationship to neuropathy. *Diabetologia* 2009;52:2478–88.
- [52] Latis S, Alexiadou K, Tsiakou A, Makrilakis K, Katsilambros N, Tentolounts N. Cardiac autonomic function correlates with arterial stiffness in the early stage of type 1 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011;2011. article ID 957901.
- [53] Malik RA, Williamson S, Abbott C, Carrington AL, Iqbal J, Schady W, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitor trandolapril on human diabetic neuropathy: randomised double-blind controlled trial. *Lancet* 1998;352:1978–81.
- [54] Sacre JW, Jennings GL, Kingwell BA. Exercise and dietary influences on arterial stiffness in cardiometabolic disease. *Hypertension* 2014;63:888–93.

## 3.6 Élasticité hépatique et rigidité artérielle

**Élasticité hépatique et rigidité artérielle sont étroitement associées chez les patients diabétiques de type 2 ou en surpoids ou obèses sans traitement anti-hypertenseur**

**Présentation orale au congrès de l'ALFEDIAM 2013**

### 3.6.1 Introduction

Les troubles métaboliques et la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) sont étroitement associés. Avec la prévalence croissante de l'obésité, du diabète et du syndrome métabolique dans la population générale, la NASH est devenue la cause la plus fréquente de la maladie hépatique chronique. Une étude récente a constaté que 34 % de la population adulte aux États-Unis a une accumulation excessive de graisse dans le foie, la plupart sans rapport avec l'abus d'alcool [518].

Les sujets qui présentent une NASH ont donc une légère augmentation du risque de décès par rapport à la population générale. Environ 1 sur 30 de ces patients peuvent développer une cirrhose ou une complication liée au foie. La cirrhose et la présence d'une intolérance au glucose (ITG) / diabète sont des facteurs de risque de mortalité globale chez les patients avec NASH et doivent donc être identifiés et traités de façon intensive lorsque cela est possible. Toutefois la mortalité globale, le taux de mortalité liée au foie, et le développement de la cirrhose chez les patients suivis par des généralistes ont été trouvés étonnamment inférieurs à ceux observés chez les patients adressés aux spécialistes [519].

Une dysfonction endothéliale a été montrée chez les sujets avec une NASH. L'augmentation des acides gras altère la signalisation insulinique dans l'endothélium et la production de NO d'une manière dose-dépendante par l'activation de l'inhibiteur de la NFκB kinase. La gluconéogenèse hépatique augmente dans la NASH ainsi que la résistance à l'insuline hépatique qui est associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline afin de maintenir un taux normal de production hépatique de glucose à jeûn. Cette demande chronique a un impact sur la cellule bêta pancréatique qui est susceptible de contribuer au développement du DT2. La NASH est un facteur de risque indépendant d'augmentation de la protéine CRP et de développement d'une inflammation systémique. L'hyperglycémie favorise elle-même le développement de la dyslipidémie athérogène et de l'hyperproduction de VLDL. L'accumulation de triglycérides au niveau myocardique qui est observée dans l'obésité et le TD2, est associée à la résistance du myocarde à l'insuline, à l'altération du métabolisme énergétique et à la dysfonction ventriculaire [520].



<b>Auteur (année) [référence]</b>	<b>Méthode utilisé pour la diagnostic de NASH</b>	<b>Critère de jugement</b>	<b>Augmentation du risque CV?*</b>
<b>Villanova et al (2005) [521]</b>	Biopsie hépatique	Fonction endothéliale	Oui
<b>Brea et al (2005) [522]</b>	Echo hépatique	Epaisseur Carotide	Non
<b>Volzke et al (2005) [523]</b>	Echo hépatique	Epaisseur Carotide	Non
<b>Targher et al (2005) [524]</b>	Echo hépatique	Evénements CV	Oui
<b>Targher et al (2006) [525]</b>	Biopsie hépatique	Epaisseur Carotide	Oui
<b>Mirbagheri et al (2007) [526]</b>	Echo hépatique	Angiographie coronaire	Oui
<b>Hamaguchi et al (2007) [527]</b>	Echo hépatique	Evénements CV	Oui
<b>Schindhelm et al (2007) [528]</b>	Dosage ALAT	Evénements CV	Oui
<b>McKimmie et al (2008) [529]</b>	Scanner	Epaisseur Carotide	Non
<b>Fracanzani et al (2008) [530]</b>	Biopsie ou Echo hépatique	Epaisseur Carotide	Oui
<b>Goessling et al (2008) [531]</b>	Dosage ASAT/ALAT	Evénements CV	Non
<b>Haring et al (2009) [532]</b>	Echo hépatique	Evénements CV	Oui
<b>Poanta et al (2011) [533]</b>	Echo hépatique	Epaisseur Carotide Intima	Non

\*Après ajustement pour les facteurs de confusion

**Tableau 22: Etudes du risque cardiovasculaire chez des patients avec NASH**

*D'après [520].*

### 3.6.2 Vitesse de l'onde de Pouls (VOP) et mortalité

La vitesse de l'onde de pouls est plus élevée chez les patients atteints de NASH [534]. Comme nous l'avons vu dans l'introduction la VOP aortique est un prédicteur puissant des événements cardiovasculaires futurs et de la mortalité de toutes causes confondues. La capacité prédictive de la rigidité artérielle est plus élevée chez les sujets présentant un risque cardiovasculaire de base plus élevé.

Référence	Population (N)	Age (années)	Hommes (%)	Suivi (années)	VOP m/s (M± DS)	Seuil VOP (Haut vs bas)
<b>Anderson et al., 2009 [271]</b>	Population générale- non diabétiques (n = 174)	60 ± 10	51.1	19.6	10.2 ± 2.1	>10.6 m/s (tertile sup)
<b>Blacher et al., 1999 [272]</b>	Dialysés (n = 241)	51.5 ± 16.3	61.0	6.0	11.1 ± 3.1	>12.0 m/s (tertile sup)
<b>Boutouyrie et al., 2002 [273]</b>	Hypertendus (n = 1,045)	51 ± 12	65.0	5.7	11.5 ± 3.5	>12.3 m/s (tertile sup)
<b>Choi et al., 2007 [274]</b>	Angor (n = 497)	57.7 ± 10.1	47.7	2.6		>12.5 m/s (tertile sup)
<b>Cruickshank et al., 2002 [275]</b>	Diabète (n = 394)	60 ± 10	60.0	10.7	11.6 ± 3.8	augmentation de 3.8-m/s
<b>Laurent et al., 2001 [276]</b>	Hypertendus (n = 1,980)	50 ± 13	65.5	9.3	11.5 ± 3.4	augmentation de 5-m/s
<b>Mattace-Raso et al., 2006 [277]</b>	Population générale (n = 2,835)	71.7 ± 6.7	39.0	4.0–9.0	13.3 ± 2.9	>14.6 m/s - hommes; >14.2 m/s - femmes
<b>Meaume et al., 2001 [535]</b>	Sujets >70 ans (n = 141)	87.1 ± 6.6	27.0	2.5	14.2 ± 3.1	>17.7 m/s (décile sup)
<b>Mitchell et al., 2010 [536]</b>	Population générale (n = 2,232)	63 ± 12	42	7.8	9.3 (7.8–11.8) médian (interquartile)	> 9.3 m/s (médiane)
<b>Pannier et</b>	Dialysés	53.1 ± 16.	62.0	5.8	11.1 ± 3.1	Tertile sup

<b>al., 2005 [537]</b>	(n = 305)	2				
<b>Shoji et al., 2001 [281]</b>	Dialysés (n = 265)	55.4 ± 10. 5	41.0	5.3	8.6 ± 2.2	>8.2 m/s (médiane)
<b>Shokawa et al., 2005 [282]</b>	Minorité ethnique (n = 492)	63.7 ± 8.8	44.7	10.0	9.7 ± 1.9	>9.9 m/s (seuil d'une courbe ROC)
<b>Sutton- Tyrrell et al., 2005 [538]</b>	Population générale (n = 2,488)	73.7 ± 2.9	48.0	4.6	9.0 ± 3.9	>8.4 m/s hommes; >7.9 m/s femmes
<b>Terai et al., 2008 [539]</b>	Hypertendus (n = 676)	62 ± 12	55.0	4.8	9.0 ± 0.6	>8.8 m/s (médiane)
<b>Wang et al., 2010 [285]</b>	Population générale (n = 1,272)	52 ± 13	53	15	9.5 ± 2.3 (hommes) 9.5 ± 2.5 (femmes)	Augmentation de 2.3 m/s, hommes; 2.5 m/s, femmes
<b>Willum- Hansen et al., 2006 [540]</b>	Population générale (n = 1,678)	40–70	52.0	9.4	11.3 ± 3.4	>13.1 m/s (quintile sup)
<b>Zoungas et al., 2007 [541]</b>	Dialysés (n = 207)	55 ± 13	67.6	3.6	>9.9 m/s (seuil)	Seuil continu

ESRD : Insuffisance rénale terminale.

**Tableau 23: Récapitulatif des études qui ont trouvé une association entre la VOP et les événements cardiovasculaires**

*D'après [542].*

### 3.6.3 Objectif

Notre objectif était de rechercher une relation entre la sévérité de la fibrose hépatique et la rigidité artérielle dans une population de patients diabétiques de type 2 et chez des sujets en surpoids ou obèses en l'absence de diabète connu.

### 3.6.4 Mesure de la fibrose hépatique : le Fibroscan

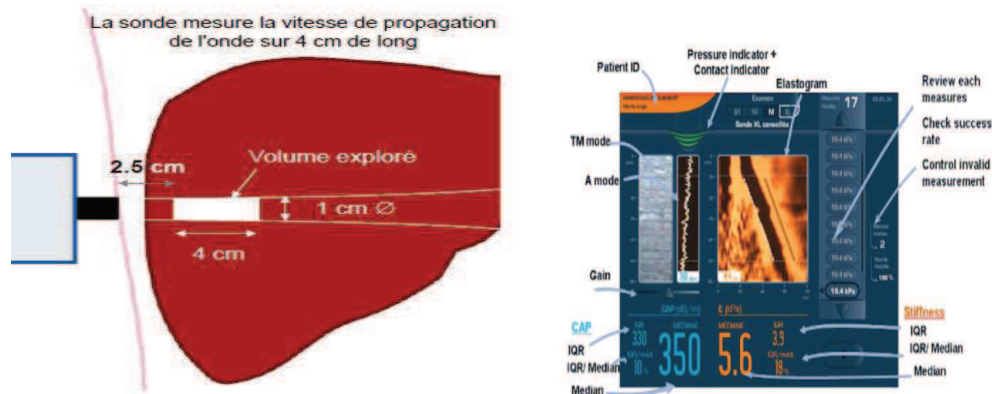


Figure 64: *Principe du Fibroscan.*

Le principe du Fibroscan® repose sur une constatation histologique : plus le foie est fibreux, plus il est dur. L'élasticité du foie peut donc être utilisée pour prédire le stade de fibrose. Pour la mesurer, le Fibroscan® utilise l'élastométrie impulsionnelle.

La vitesse de propagation de l'onde de choc calibrée exercée par la sonde de l'appareil est mesurée par ultrasons. La mesure obtenue permet de quantifier la dureté du foie : plus il est dur, donc fibreux, plus la propagation de l'onde est rapide. Cette élasticité s'exprime en kilo Pascal (kPa) comme pour une pression.

Le patient doit être à jeûn depuis 2 heures. Les mesures sont réalisées sur le côté droit, au niveau du foie, par voie intercostale. Le patient est allongé sur le dos avec le bras droit relevé derrière la tête. La sonde est perpendiculaire à la surface de la peau. Le patient perçoit la percussion du vibreur sur la peau de façon totalement indolore (pichenette). Il est parfois nécessaire de faire les mesures en apnée. L'opérateur doit réaliser au moins 10 mesures valides.

### 3.6.5 Méthodes

Nous avons recueilli de façon rétrospective les données chez 106 patients suivis dans notre service sans antécédent hépatique ni consommation abusive d'alcool. Parmi eux 89 étaient diabétiques de type 2. Les patients ont eu un examen de l'élasticité hépatique et de la rigidité artérielle pendant leur hospitalisation. Pour notre étude le seuil de 8 kPa était utilisé pour définir les patients avec une fibrose et une VOP >11m/sec pour définir le groupe avec une rigidité artérielle.

Pour 10 patients nous n'avons pas pu obtenir de données complètes sur leur traitement.

L'analyse porte donc sur 96 patients. Pour l'étude seulement les patients traités pour leur HTA ont été considérés comme hypertendus (HT).

### **3.6.6 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS statistiques (version 13.0, Chicago, IL). Les variables ont été exprimées en moyenne  $\pm$  SD ou sous forme de pourcentages. Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour mesurer les associations entre les variables continues. Un modèle de régression linéaire ajusté sur, l'âge, la durée du diabète et la PA systolique a été utilisé. Les groupes ont été comparés par l'analyse de la variance lorsque les écart types étaient homogènes. Lorsque les écart types n'étaient pas homogènes, même après transformation, nous avons utilisé des tests non paramétriques. Le test du chi carré a été utilisé pour les variables catégorielles et pourcentages.

### 3.6.7 Résultats

	<b>TOTAL (N=96)</b>	<b>NORMOTENDUS (N=37)</b>	<b>HYPERTENDUS (N=59)</b>	<b>P*</b>
<b>SEXE (F/M)</b>	46/50	19/18	27/32	0,594
<b>AGE (ANNEES)</b>	54,8±12	51,1±12,5	57,1±11,2	0,015
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	31,8±6,6	31,6±7	31,9±6,3	0,831
<b>FREQUENCE CARDIAQUE (bpm)</b>	70,7±12	69,8±11,1	71,3±12,6	0,564
<b>DIABETE (OUI/NON)</b>	83/13	28/9	55/4	0,014
<b>DUREE DIABETE (ANNEES)</b>	8,3±7,7	5,7±5,5	9,6±8,4	0,062†
<b>ELASTOMETRIE (kPa)</b>	6,9±4,6	7,8±6,2	6,3±3,2	0,646†
<b>GLYCEMIE A JEUN (mmol/L)</b>	7,3±2,6	7±2,3	7,5±2,8	0,408
<b>HbA1c (%)</b>	7,2±1,4	7,1±1,6	7,2±1,4	0,765
<b>FRUCTOSAMINE</b>	276,5±58,1	274,6±62,9	277,9±55,2	0,791
<b>CREATININE (µmol/L)</b>	84,7±23,7	79,1±15,4	88,2±27,2	0,068
<b>CHOLESTEROL TOTAL (mmol/L)</b>	4,8±1	4,7±0,9	4,9±1,1	0,216†
<b>HDL-C (mmol/L)</b>	1,3±0,4	1,2±0,3	1,3±0,4	0,421
<b>LDL-C (mmol/L)</b>	2,8±0,9	2,7±0,9	2,8±1	0,74
<b>TRIGLYCERIDES (mmol/L)</b>	1,9±1,9	1,6±1,1	2,0±2,3	0,368
<b>ASAT (U/L)</b>	26,6±9,7	25,8±11,3	27,1±8,5	0,531
<b>ALAT (U/L)</b>	30,5±18,2	28±20,5	32,1±16,5	0,291
<b>GGT (U/L)</b>	48,8±75,2	46,4±50,4	50,4±88,5	0,802
<b>FERRITINE (µg/L)</b>	152,3±149,2	112,4±79,5	177,2±175,8	0,274†
<b>MICROALBUMINURIE 24H (mg/L)</b>	55,7±184,9	17,7±24,9	84,2±240,9	0,350†
*ANOVA † TESTS NON PARAMETRIQUES				

**Tableau 24: Caractéristiques de notre cohorte.**

Parmi nos patients hypertendus 21,9% était sous IEC et ou ARA2 20,8% sous diurétiques et 19,8% sous β-bloquant.

	<b>TOTAL (N=96)</b>	<b>NORMOTENDUS (N=37)</b>	<b>HYPERTENDUS (N=59)</b>	<b>P*</b>
<b>PAS (mmHg)</b>	130,6±17,8	123,4±13,9	135,1±18,6	<0,001
<b>PAD (mmHg)</b>	75,1±10,5	72,8±8,5	76,5±11,4	0,253†
<b>PP (mmHg)(</b>	55,5±15,2	50,6±11,1	58,6±16,6	0,011
<b>PAM (mmHg)</b>	94,3±12,0	90,7±9,9	96,5±12,7	0,114
<b>FREQUENCE CARDIAQUE (bpm)</b>	70,7±12	69,8±11,1	71,3±12,6	0,564
<b>PAS AORTIQUE (mmHg)</b>	118,8±16,9	112,1±13,1	123,1±17,7	0,002
<b>PAD AORTIQUE (mmHg)</b>	76,2±10,7	74,0±8,7	77,5±11,6	0,283†
<b>AIx (%)</b>	23,3±11,2	21,3±11,6	24,6±10,9	0,165
<b>VOP (m/sec)</b>	8,8±2,2	8,0±2,2	9,3±2,1	0,008
*ANOVA † TESTS NON PARAMETRIQUES				

**Tableau 25: Paramètres hémodynamiques**

Les patients normotendus et hypertendus différaient sur la PAS périphérique et centrale et la VOP.

		<b>VOP&lt;11</b>	<b>VOP≥11</b>	<b>TOTAL</b>	<b>P</b>
<b>NORMOTENDUS</b>	<b>ELASTO &lt;8</b>	29 (30,2%)	0 (0%)	29 (30,2%)	<0,001
	<b>ELASTO ≥8</b>	4 (4,2%)	4 (4,2%)	8 (8,3%)	
	<b>TOTAL</b>	33 (34,4%)	4 (4,2%)	37 (38,5%)	
<b>HYPERTENDUS</b>	<b>ELASTO &lt;8</b>	38 (39,5%)	11 (11,5%)	49 (51,0%)	0,373
	<b>ELASTO ≥8</b>	9 (9,4%)	1 (1,0%)	10 (10,4%)	
	<b>TOTAL</b>	47 (49%)	12 (12,5%)	59 (61,5%)	

**Tableau 26: Rigidité artérielle et fibrose hépatique.**

La fibrose hépatique est fréquente, montrée chez 19% (18/96) de cette population principalement de patients DT2. Chez les normotendus la rigidité artérielle est plus fréquente quand la fibrose hépatique est présente 50% (4/8) vs absente 0%, p<0.001.

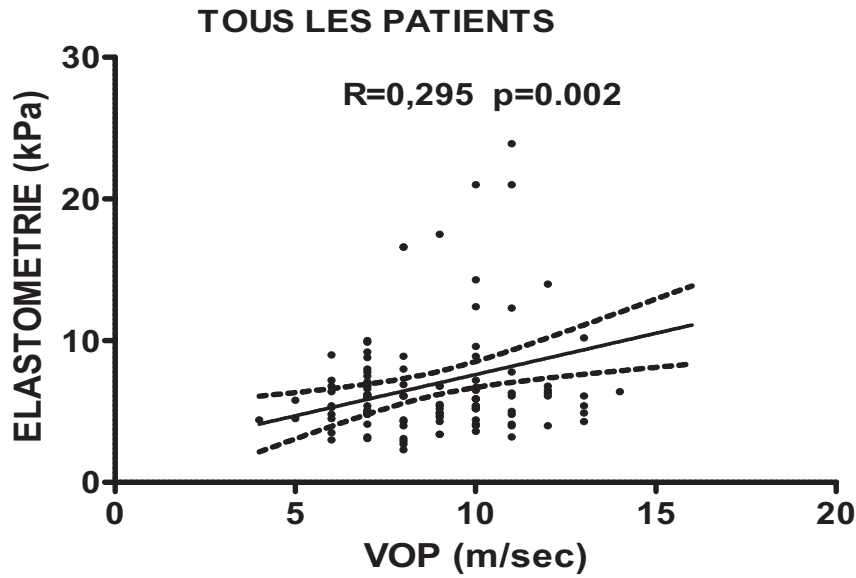


Figure 65: *Corrélation entre VOP et élasticité hépatique.*

*Après ajustement sur l'âge, sur la durée du diabète et la PA systolique;  $R=0,28$ ,  $p=0,008$ .*

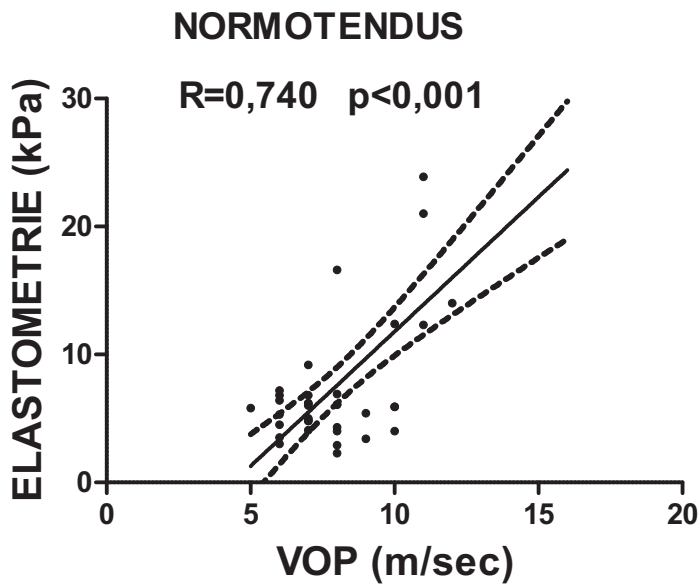


Figure 66: *Corrélation entre VOP et élasticité hépatique chez les normotendus*

*Chez les normotendus la VOP restait corrélée à l'élasticité hépatique après ajustement sur l'âge, sur la durée du diabète et la PA systolique :  $R=0,712$   $p<0,001$ .*



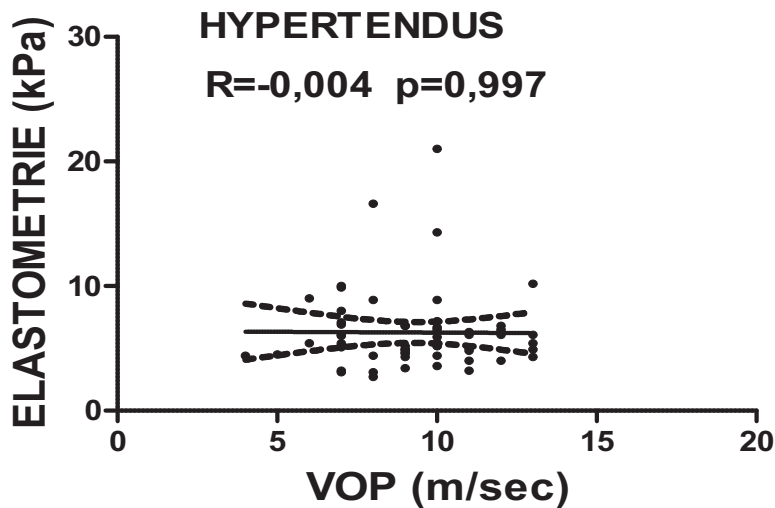


Figure 67: *Corrélations entre VOPet élasticité hépatique chez les hypertendus*

Chez les hypertendus la VOP n'était pas corrélée à l'élasticité hépatique.

Le traitement de l'hypertension qui diminue la VOP pourrait être un facteur confondant susceptible d'expliquer l'absence de corrélation.

### 3.6.8 Conclusion

La fibrose est de plus en plus appréciée comme un acteur majeur dans le dysfonctionnement d'autres types de tissus et récemment pour le tissu adipeux. Dans l'expansion du tissu adipeux, l'hypoxie généralisée conduit à une augmentation excessive de matrice extracellulaire (MEC), une accumulation dans les tissus adipeux avec un impact pour la dysfonction métabolique [543].

La fibrose peut aussi être le résultat d'une inflammation locale. La fibrose est généralement définie comme une accumulation excessive de composantes de la MEC, qui peut résulter d'un déséquilibre entre l'excès de synthèse des composants fibrillaires, tels que les collagènes I, III et VI, et une diminution de la dégradation de ces protéines.

L'impact pathologique de la fibrose et de l'inflammation sur l'obésité et les troubles métaboliques liés à l'obésité a été largement étudié au cours des dernières années. Malgré de nombreuses questions non résolues, des études ont permis d'élucider certains mécanismes moléculaires sous-jacents de la régulation du tissu adipeux, de son remodelage et de son impact sur la dysfonction métabolique, chez l'homme. L'accumulation de la fibrose est l'aboutissement de plusieurs processus pathologiques et peut affecter différents organes, tels que le foie, le cœur et les reins [544].

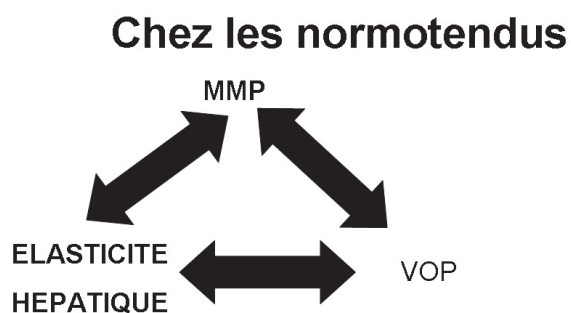
La rigidité de l'environnement extracellulaire joue un rôle dans l'orientation de la division cellulaire et le maintien des limites des tissus ; elle dirige la migration et la différenciation cellulaires. En outre, la rigidité de la MEC est importante pour maintenir l'homéostasie tissulaire normale, et lorsque la mécanique de la matrice devient déséquilibrée, la maladie va progresser [545].

On sait que la rigidité artérielle est corrélée aux taux sériques d'enzymes qui induisent la fibrose [546]. Chez nos patients la fibrose hépatique est fréquente : 19% dans cette population principalement de DT2. Sa sévérité est corrélée indépendamment de l'âge et de la PA à la rigidité artérielle, un témoin précoce d'athérosclérose périphérique chez des sujets plus jeunes et normotendus.

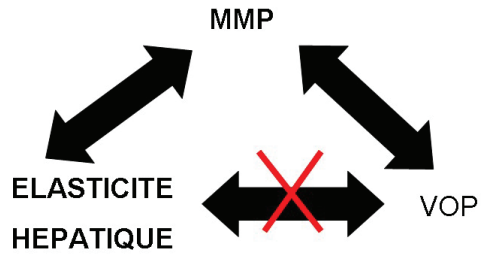
Ce qui était inattendu était la disparition de l'association entre la fibrose hépatique et la rigidité artérielle chez les hypertendus, sans doute en rapport avec le traitement antihypertenseur qui en diminuant la VOP, a pu atténuer cette association.

Rappelons enfin que certains antihypertenseurs comme les IEC inhibent les MMP [547] et modifient la MEC, et pourraient éventuellement diminuer la fibrose [548].

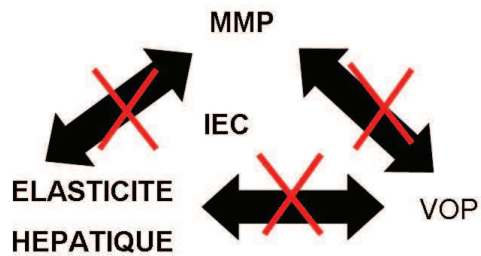
Suite à cette première analyse rétrospective sur une population limitée nous avons entrepris une série prospective et devons prochainement analyser les résultats



## DANS L'HTA TRAITEE



## DANS L'HTA TRAITEE, EFFET DES IEC



**Figure 68:** *Hypothèse physiopathologique*

*Chez les normotendus la VOP restait corrélée à l'élasticité hépatique.*

*Chez les hypertendus traités la VOP n'était pas corrélée à l'élasticité hépatique.*

*Hypothèse physiopathologique : Les IEC peuvent à la fois diminuer la VOP et inhiber les MMP responsables de l'accumulation de la MEC et de la fibrose hépatique.*

## 4 Conclusions

Dans la première partie de la thèse, nous avons effectué une étude métabolique chez des sujets obèses sans dysglycémie connue au moment de l'étude, recrutés de façon prospective dans le cadre de leur bilan d'obésité. Cette étude s'inscrit dans les travaux de Monnier portant sur la contribution de la glycémie post prandiale à l'exposition totale au glucose, exprimée par le taux l'HbA1c.

Notre objectif était d'améliorer notre connaissance de la variabilité glycémique et de comprendre son rôle physiologique dans les complications du prédiabète et du diabète. Nous avons intégré de holters glycémiques et calculé des indices de la variabilité glycémique dans les états prédiabétiques. L'intérêt de ces travaux réside dans l'existence d'association entre la neuropathie périphérique, la rétinopathie et l'intolérance au glucose : la présence d'un stress oxydatif de faible amplitude répétitif lié à la variabilité glycémique pourrait favoriser ces complications précoces.

Nos résultats ont montré que la variabilité glycémique est plus forte en présence d'une dysglycémie et augmente avec l'HbA1c. La perte du contrôle de la glycémie post-prandiale est observée avant la détérioration de la glycémie à jeun et précède l'apparition du diabète. La glycémie post prandiale est le principal contributeur de l'hyperglycémie globale, dans tous les quartiles d'HbA1c, même si cette contribution diminue de premier au quatrième quartile (pour une HbA1c de 5,1% à 7,4%). Ainsi, la contribution plus forte de la glycémie post-prandiale sur l'hyperglycémie globale pour les taux d'HbA1c plus bas rapportée par Monnier et al chez les DT2 se retrouve également dans le prédiabète, même pour des taux d'HbA1c normaux. En outre, nous avons retrouvé une bonne corrélation entre la cinétique de la charge orale en glucose et celle d'un petit déjeuner standardisé. Ce repas est plus physiologique et ressemble aux habitudes alimentaires des Français. Nous avons de ce fait utilisé ce petit déjeuner comme test dans les études NUTRIVASC et INSUVASC.

Dans la deuxième partie de la thèse qui correspond aux résultats de l'étude NUTRIVASC, nous avons décrit la réponse physiologique des intégrateurs du risque cardiovasculaire pendant la période post-prandiale chez le sujet âgé sans facteur de risque cardiovasculaire. Nous avons en outre évalué l'impact des recommandations du PNNS.

Chez les personnes âgées saines, l'augmentation du débit cardiaque après l'ingestion d'un repas dépend de l'augmentation de la FC sans que cet effet passe par l'inhibition vagale (qui est immédiate) ou l'activation sympathique cardiaque. Les résultats hémodynamiques montrent qu'en post-prandial, la PAS périphérique et centrale et la PA moyenne diminuent. Le retour veineux augmente et contribue probablement à la redistribution du flux sanguin vers la circulation splanchnique.

L'explication de l'augmentation de la FC pourrait venir de l'effet du GLP1 car les récepteurs GLP-R1 ont été identifiés sur les cardiomyocytes à proximité du noeud sinusal [549]. L'effet combiné de l'insuline et du GLP-1 peut contribuer à augmenter la FC, y compris l'inhibition vagale, l'activation sympathique et éventuellement l'activation des baroréflexes [550].

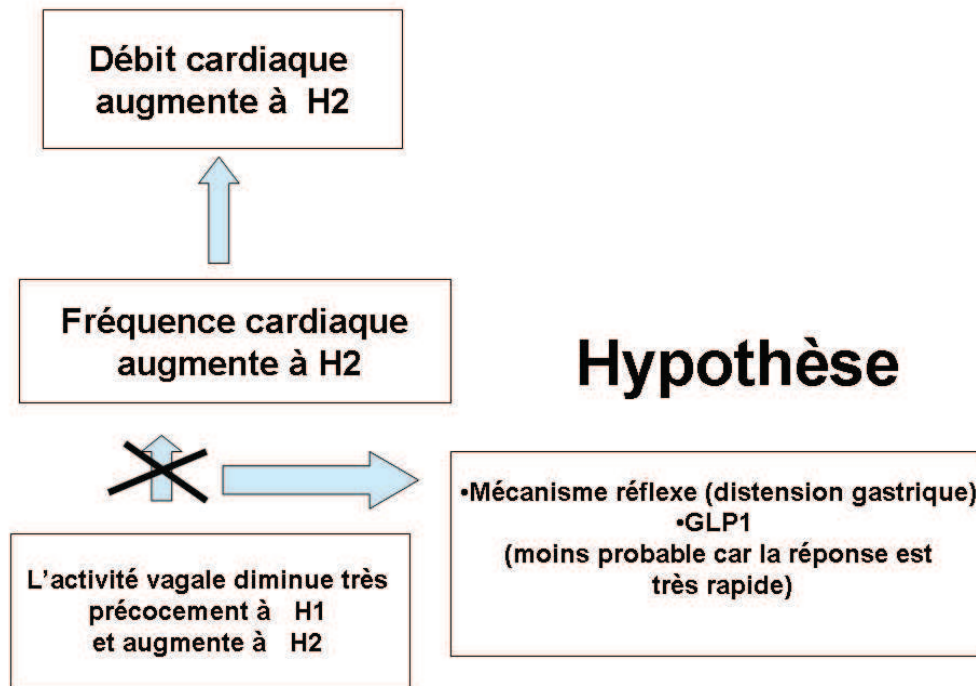
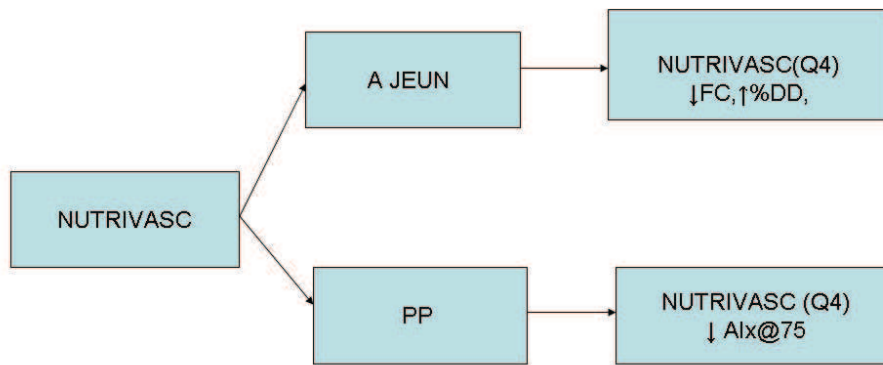


Figure 69: Probable mécanisme de l'accélération de la FC

Chez les sujets qui suivent les recommandations du PNNS, la FC de repos est plus lente, la diastole est plus longue et l'indice de la viabilité myocardique est plus élevé. Les recommandations pourraient donc avoir un effet bénéfique au niveau cardiovasculaire en améliorant la perfusion myocardique et en limitant le vieillissement vasculaire. Pendant la période post-prandiale, les sujets qui suivent les recommandations du PNNS ont eu un  $Aix@75$  (une mesure indirecte de la rigidité artérielle qui dépend de la réflexion) plus bas. Le retour tardif des ondes de PA diminue l'amplitude de la PAS et la pression pulsée centrale, la post-charge dans le ventricule gauche et la demande en oxygène du myocarde.



**Figure 70: Résultats de l'étude NUTRIVASC**

L'étude INSUVASC a été menée chez des patients atteints de longue date de DT2 avec un mauvais contrôle glycémique, mais ayant une faible prévalence de complications microangiopathiques.

Pendant la visite 1 (avant le traitement par insuline), nous avons étudié l'effet du repas sous metformine. Le flux sanguin cutané augmentait 1 heure et 2 heures après le petit déjeuner (+ 36,9 % et + 45,6 %, respectivement), avec une amélioration de la fonction endothéliale.

Comme attendu, 4 semaines de traitement par insuline améliorait glycémie à jeûn et post-prandiale, HbA1c et fructosamine.

Nous avons montré qu'un traitement de 4 semaines par insuline en ajout à la metformine chez des patients DT2 insuffisamment contrôlés par la metformine et une sulfonylurée améliore la fonction endothéliale microvasculaire à jeun. Cependant, le traitement par les analogues de l'insuline n'a eu pratiquement aucun effet supplémentaire sur le FSC basal, ni à jeun ni après les repas, comparativement à la metformine seule. Nous avons cependant observé une amélioration de la fonction endothéliale avec la diminution des marqueurs d'activation endothéliale, la Sélectine E et VCAM-1, à jeun et après traitement à l'insuline comme déjà publié par notre groupe. Cet effet favorable pour l'endothélium n'était pas lié à une amélioration du stress oxydatif. Nous faisons l'hypothèse que les patients bénéficiaient déjà des propriétés antioxydants de la metformine et du jus d'orange du petit déjeuner.

L'indice RHI mesure la fonction endothéliale des petites artères de la main suite à une ischémie par la compression de l'artère branchiale. Pendant l'étude INSUVASC, suite à l'insulinothérapie nous obtenons aussi, d'après cet indice une amélioration de la fonction

endothéliale pendant la période post-prandiale. Cette réponse devient plus précoce à 1 heure, et cet effet ne diffère pas entre les 3 groupes de traitement insulinique.

La concentration plasmatique de leptine était corrélée négativement avec l'indice de perfusion myocardique (SEVR). Les taux de la leptine sont également élevés en cas de maladies cardiovasculaires, comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque congestive, l'infarctus du myocarde ou le remodelage cardiaque. Nos résultats suggèrent donc que les taux élevés de leptine pourraient être un indice d'altération de la microcirculation cardiaque.

Le traitement par insuline a un effet chez les patients avec DT2 ayant une faible activité vagale avec une FC plus élevée et une diastole plus courte. L'insulinothérapie atténuée en post-prandial les différences sur la diastole même après ajustement pour la FC.

L'effet de l'insulinothérapie n'est pas le même en présence d'une hypertension, l'activité autonome est modifiée après insulinothérapie chez les normotendus (activation sympathique et inhibition vagale) et pas chez les hypertendus. Le traitement par insuline semble rétablir l'aspect de la réponse physiologique (activation sympathique et inhibition vagale) décrite dans l'étude NUTRIVASC, chez les diabétiques normotendus qui montrent une réactivité du système nerveux autonome cardiaque après un traitement par insuline.

La présence de l'HTA modifie après un traitement par insuline la rigidité artérielle en post prandial. Le temps de réflexion de l'onde incidente, la VOP et la fonction endothéliale sont différents en post prandial chez les diabétiques hypertendus.

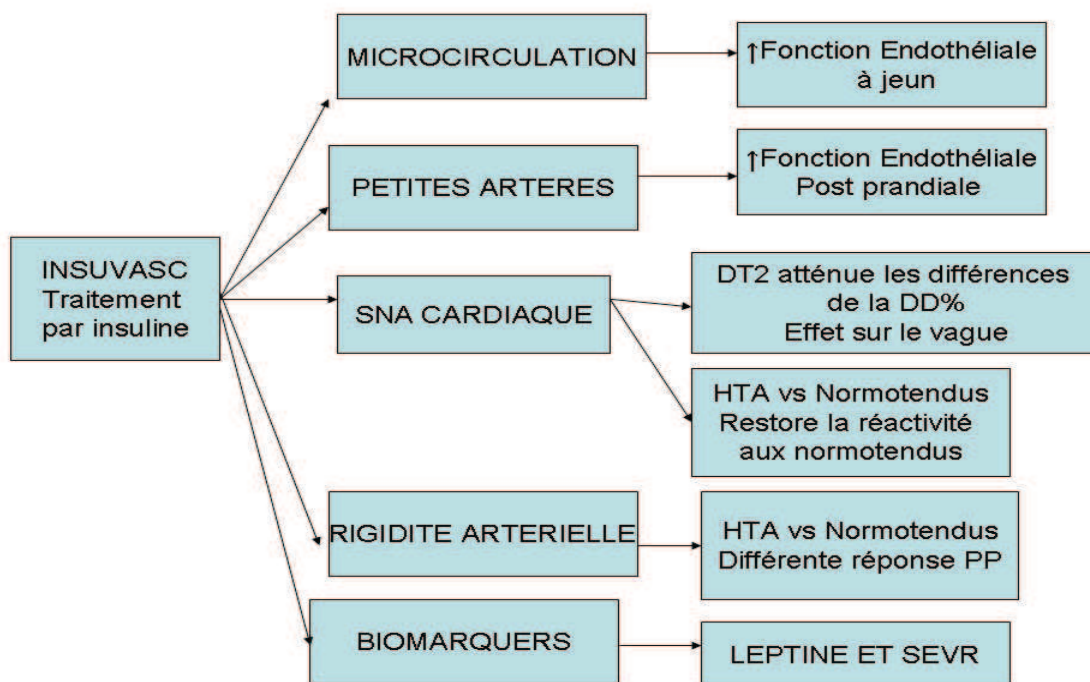
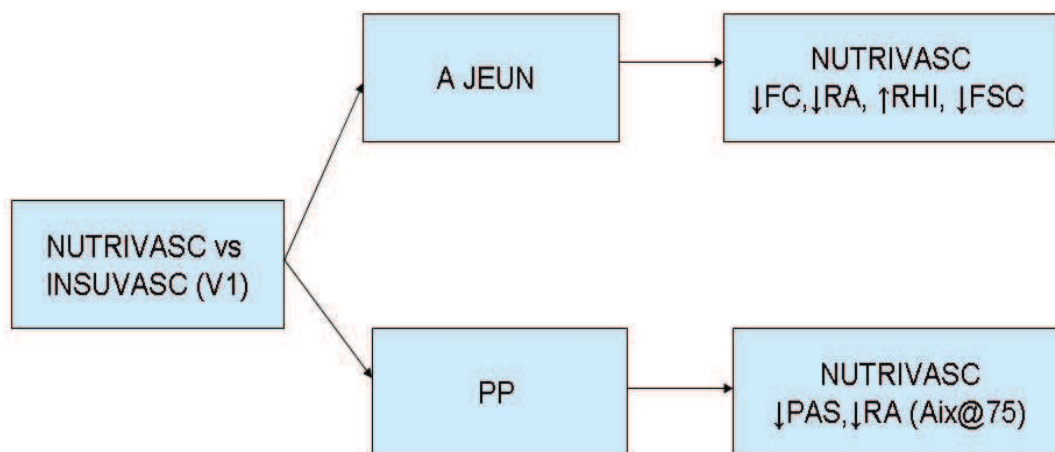


Figure 71: Résultats de l'étude INSUVASC.

La comparaison des populations de NUTRIVASC et d'INSUVASC met en exergue de différents types de réponses post-prandiales. Les sujets sains n'avaient pas une rigidité artérielle élevée et présentaient une meilleure fonction endothéliale avec un flux sanguin plus bas. Les résultats à jeun ont montré que l'effet bénéfique sur la diastole et la rigidité artérielle dépendait de la FC, qui était plus basse dans le groupe NUTRIVASC.

Pendant la période post-prandiale, durant laquelle il existe toujours une différence sur la FC, nous avons retrouvé les mêmes différences entre les 2 populations sur les PA systoliques et pulsées, périphériques et centrales. La réponse de la PAS aortique n'est pas la même : dans la population de NUTRIVASC, il y a une diminution de la PA contrairement à la population d'INSUVASC qui exhibe une petite augmentation.

Il existe une dissociation de la réponse post-prandiale de l'Aix en périphérie et au niveau aortique entre les 2 populations. Les patients diabétiques augmentent leur Aix à la fin du test et ce résultat persiste même après ajustement sur la FC (Aix@75) et a été reproduit sur les enregistrements d'ENDOPAT.



**Figure 72 : Nutrivasc vs INSUVASC (V1) résultats**  
RA : Rigidité Aortique

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons étudié l'influence de la neuropathie diabétique et de la fibrose hépatique sur la rigidité artérielle des diabétiques. Pour les 2 paramètres, le traitement antihypertenseur semblait exercer un effet protecteur chez les patients hypertendus. La rigidité artérielle devrait être évaluée dans les DT2 avec neuropathie périphérique et en cas de fibrose hépatique.

Parmi les patients diabétiques normotendus, ceux avec une neuropathie périphérique étaient deux fois plus susceptibles d'avoir une valeur de VOP au-dessus du 90ème percentile des valeurs de référence que ceux sans neuropathie (53% vs 27 %). Le pourcentage de patients normotendus avec neuropathie périphérique ayant une VOP élevée était également plus élevé que chez les patients hypertendus avec ou sans neuropathie périphérique.



La fibrose hépatique était fréquente dans notre série de patients principalement diabétiques de type 2. Sa sévérité était corrélée à la rigidité artérielle indépendamment de l'âge et de la PA qui est un témoin précoce d'athérosclérose périphérique, chez des sujets plus jeunes et normotendus. La disparition de l'association entre la fibrose et la rigidité artérielle chez les patients hypertendus était inattendue.

Il apparaît donc que l'effet du traitement par insuline sur les intégrateurs du risque cardiovasculaire devrait être étudié séparément chez les patients hypertendus et normotendus. Notre travail montre l'intérêt des explorations de la phase post-prandiale et l'étude des plusieurs cibles cardiovasculaires pour comprendre les différences de la PA et de la FC.

# 5 Annexe

## 5.1.1 Paramètres mesurés et calculés par Sphygmocor

PARAMETRE	FORMULE	SYMBOLE	UNITES
Début de l'onde		$T_0$	msec
Temps pour le 1er pic-Aortique		$T_1$	msec
Temps pour le 2eme pic-Aortique		$T_2$	msec
Fin de l'onde		$T_F$	msec
Temps nécessaire pour le retour de l'onde de réflexion. Tr est le plus souvent $> T_1$		$Tr$	msec
Durée de l'éjection: de $T_0$ qui représente l'ouverture de la valve aortique jusqu'à sa fermeture	$ED = T(\text{incisura}) - T_0$	ED	msec
Période, la durée moyenne d'un onde	$PD = T_F - T_0$	PD	msec
FC	$HR = 1000 \times 60 / PD$	HR	Bat/min
<b>Variables de la pression</b>			
Pressions systoliques et diastoliques périphériques		$Sp, Dp$	mmHg
Pressions systoliques et diastoliques aortiques		$Sp, Dp$	mmHg
Pression pulsée périphérique et Aortique	$PP = Sp - Dp$	PP	mmHg

Pression moyenne Périphérique et Aortique. (Vrai calcul sans approximation)	$MP = \frac{\sum_{i=I_0}^{I_f} P_i}{n}$ <p><i>P<sub>i</sub></i> = Points de pression,  <i>n</i> = nombre</p>	MP	mmHg
PA moyenne (Systolique, Diastoliques)	$MP(Sp) = \frac{\sum_{i=I_0}^{ED} P_i}{n}$ $MP(Dp) = \frac{\sum_{i=ED}^{I_f} P_i}{n}$	MP	mmHg

**Tableau 27: Paramètres de l'onde centrale.**

PARAMETRE	FORMULE	SYMBOLE	UNITES
Pression à T <sub>1</sub> (premier pic)		P1	mmHg
Pression à T <sub>2</sub> (deuxième pic)		P2	mmHg
Augmentation (pour l'onde aortique)	$AG = P_2 - P_1$	AG	mmHg
Index d'Augmentation (AG/PP, P2/P1) AG/PP : Il s'agit de la de l'augmentation ou la diminution de la hauteur de la pulsation suite à la présence de l'onde de réflexion. P2/P1: Il s'agit de la taille du pic de l'onde de réflexion par rapport au pic de l'onde incident e	$AI(AG/PP) = \frac{P_2 - P_1}{Sp - P(T_0)} \times 100$ $AI(P_2/P_1) = \frac{P_2 - P(T_0)}{P_1 - P(T_0)} \times 100$	AI	%
Pression de l'onde incidente à T <sub>1</sub>	$P_1H = P_1 \cdot Dp$	P1 H	mmHg
PA télodystolique	$ESp = P(ED)$	ESp	mmHg
Indice de Buckberg (Sub- Endocardial Viability Ratio, SEVR, Ad/As) Aire sous courbe systolique /min = Tension Time Index (TTI) - Aire sous courbe diastolique min = Diastolic Time Index (DTI)	$SEVR = \frac{DTI}{TTI} \times 100$ $TTI = HR \times MP(Sp) \times (ED - T_0)$ $DTI = HR \times MP(Dp) \times (T_F - ED)$	SEVR	mmHg

Tableau 28: *Index d'augmentation et SEVR.*

### 5.1.2 Variables mesurés par impédancemétrie cardiaque (ICG)

Les variables suivantes peuvent être mesurés avec l'ICG:

$Z_0$

$Z_0$  [ohm] est l'impédance thoracique déduite du signal ICG

$$Z_0 = \frac{1}{t_{QRSi+1} - t_{QRSi}} \int_{t_{QRSi}}^{t_{QRSi+1}} (Z_0(t) \cdot dt)$$

#### Left Ventricular Ejection Time (LVET)

LVET [ms] est la période entre l'ouverture (B) et la fermeture aortique (déduit de l'ICG).

Pour la détermination du point X, l'algorithme est utilisé en

$$LVET = t_{Xi} - t_{Bi}$$

#### Pre Ejection Period (PEP)

PEP [ms] est la période entre l'onde R de l'ECG et l'ouverture (B) de la valvule aortique de l'ICG:

$$PEP = t_{Bi} - t_{QRSi}$$

#### Volume d'éjection (Stroke Volume SV), indice de pulsatilité (Stroke Index SI)

Le volume d'éjection est la quantité de sang [ml] que le ventricule gauche éjecte à chaque battement de coeur dans l'aorte. L'indice de pulsatilité est le volume d'éjection rapporté au Body Surface Area (BSA) du patient:

$$SV = -\rho \frac{l^2}{Z_0^2} \cdot C_i \cdot LVET \quad SI = \frac{SV}{BSA}$$

#### Débit cardiaque (Cardiac Output CO, Cardiac Index CI)

CO [l/min] est la quantité de sang qui circule par minute dans tout le système cardio-vasculaire. CI [l/(min \* m<sup>2</sup>)] est rapporté au BSA (surface corporelle)

$$CO = SV \cdot HR$$

$$CI = \frac{CO}{BSA}$$

### Résistances périphériques totales (Total Peripheral Resistance TPR, TPRI)

TPR [dyne\*s/cm<sup>5</sup>] correspond à la difficulté qu'a le ventricule gauche à éjecter le sang dans les grands et petits vaisseaux sanguins. La pression veineuse centrale (CVP) est réglée à l'avance à une valeur de 3 mmHg. TPRI [dyne\*s\*m<sup>2</sup>/cm<sup>5</sup>] est rapporté au BSA:

$$TPR = \frac{MABP - CVP}{CO} \cdot 80$$

$$TPRI = \frac{MABP - CVP}{CI} \cdot 80$$

### Liquide thoracique (Thoracic Fluid Content TFC)

Le TFC [1/Ohm] est la quantité complète de liquide qui se trouve dans le thorax et représente le retour veineux (déduite du signal ICG):

$$TFC = \frac{1}{Z_0}$$

### Indice de contractilité (Index of Contractility IC)

IC [1000/s] représente le flux maximal de sang au moment de l'éjection du ventricule gauche (déduit du signal ICG):

$$IC = \frac{dZ/dt_{max}}{Z_0} \cdot 1000$$

### Acceleration Index (ACI)

ACI [100/s<sup>2</sup>] est l'accélération maximale du signal d'impédance (deuxième dérivation) entre l'ouverture de la valve aortique et le dZ/dt<sub>max</sub> (déduite du signal ICG)

$$ACI = \frac{d^2Z/dt^2_{max}}{Z_0} \cdot 100$$

### Systolic Time Ratio (STR)

STR [%] représente la relation entre PEP et LVET :

$$STR = \frac{PEP}{LVET} \cdot 100$$

### Ejection Rate (ER)

ER [%] représente la relation entre le temps d'éjection VG rapporté à l'intervalle RR:

$$ER = \frac{LVET}{RRI} \cdot 100$$

### Left Ventricular Work Index (LVWI)

LVWI [kg\*m/m<sup>2</sup>] représente le travail du ventricule gauche, rapporté au BSA. PAOP est la pression de fermeture de l'artère pulmonaire (Pulmonary Artery Occluded Pressure) qui s'élève normalement à 7-12mmHg. La PAOP est réglée à l'avance à une valeur de 7 mmHg:

$$LVWI = const \cdot (MABP - PAOP) \cdot CI$$

### Mean Systolic Ejection Rate (MSER)

MSER [ml/s] représente la relation entre SV et LVET:

$$MSER = \frac{SV}{LVET}$$

### Rapid Ejection Period (REP)

REP [ms] est la période entre l'onde R de l'ECG et  $Z/dt_{max}$  de l'ICG et représente un paramètre de contractilité

$$REP = t_{dZ_{max}} - t_B$$

### Heather Index (HI)

HI [1/s<sup>2</sup>] représente l'inotropie cardiaque positive:

$$HI = \frac{dZ/dt_{max}}{Z_0(t_{dZ_{max}} - t_{QRS})}$$

### 5.1.3 Etude ACCES - Résumé

ACute and Chronic Effects of Saxagliptin (ACCES) (NCT01521312)

#### **Etudes ACCES Glucose et ACCES Vasculaire :**

#### **Effets aigus et chroniques de la saxagliptine sur l'intolérance au glucose et sur les intégrateurs micro- et macro-vasculaires. Une étude pilote de phase 2 randomisée contre placebo**

L'intolérance au glucose est un état pré-diabétique défini par une glycémie 2 heures après ingestion de 75 g de glucose élevée. Cet état est associé à un risque cardiovasculaire augmenté. L'activité vago-sympathique, la rigidité artérielle et la fonction endothéliale sont des intégrateurs de risque cardio-vasculaire dont les modifications concomitantes après un repas ou la prise de sucre sont peu connues. En outre, l'influence du contrôle glycémique sur ces paramètres n'a pas été étudiée, notamment chez les intolérants au glucose. La saxagliptine est un inhibiteur des dipeptidyl-peptidases type 4 (IDPP4). Elle augmente la durée de vie du glucagon like peptide 1 et réduit chez le patient diabétique de type 2 la glycémie à jeun et la glycémie post-prandiale.

L'étude pilote ACCES Glucose a exploré les effets de la saxagliptine versus placebo sur le statut glycémique. Il s'agit d'une étude prospective, randomisée versus placebo, en double aveugle, contrôlée avec les objectifs suivants :

- Déterminer les effets aigus de la saxagliptine sur la glycémie lors d'un petit-déjeuner standardisé,
- Déterminer les effets d'un traitement de 12 semaines par la saxagliptine sur la glycémie avant et après un petit-déjeuner standardisé et sur l'HbA1c,
- Déterminer les effets d'un traitement de 12 semaines par la saxagliptine sur les résultats de la charge en glucose et le statut «intolérant au glucose», le traitement étant arrêté la veille des explorations.

L'étude pilote ACCES Vasculaire a exploré les effets de la saxagliptine versus placebo sur la fonction endothéliale, la rigidité artérielle et l'activité vagosympathique avec les objectifs spécifiques suivants :

- Déterminer les effets aigus après la première prise de saxagliptine sur ces paramètres pendant un petit-déjeuner standardisé, et leur relation potentielle avec la diminution glycémique



- Déterminer l'effet chronique (12 semaines) de la saxagliptine versus placebo sur ces paramètres lors d'un petit-déjeuner standardisé et leur potentielle relation avec leur effet hypoglycémiant.

- Les résultats dans le groupe placebo montreront le rôle du petit-déjeuner standardisé sur ces paramètres vasculaires.

Les patients ont été recrutés dans le service d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition de l'hôpital Jean Verdier (Bondy) et inclus après accord et signature d'un consentement. Il s'agit d'intolérants au glucose diagnostiqués dans le mois précédent, âgés de 18 à 70 ans. Les critères de non-inclusion étaient les suivants: la grossesse en cours ou prévue pendant l'étude, un diabète, un index de masse corporelle  $>45 \text{ kg/m}^2$ , une hypertension non contrôlée, une insuffisance rénale modérée ou sévère, une insuffisance hépatocellulaire sévère, une maladie respiratoire chronique, une artériopathie oblitérante des membres inférieurs, une arythmie cardiaque ou des extrasystoles auriculaires ou ventriculaires, des troubles de la repolarisation. Vingt quatre patients sont inclus dans l'étude. Un holter glycémique a été posé pour l'enregistrement continu du glucose interstitiel pendant 36 heures puis les sujets ont été randomisés en double aveugle 1/1 pour un traitement par saxagliptine 5 mg, un IDPP4 ou un placebo. Le lendemain, les explorations vasculaires étaient effectuées sous traitement au cours d'une demi-journée. Le protocole des explorations est le même que dans l'étude NUTRIVASC et l'étude INSUVASC. Ces paramètres étaient évalués avant et au cours des 3 heures suivant un petit-déjeuner standardisé. Il s'agit des paramètres biologiques métaboliques, endothéliaux et du stress oxydant, de la rigidité artérielle, de la fonction endothéliale et du système nerveux autonome cardiovasculaire qui ont été mesurés par des méthodes non invasives : Sphygmocor®, Task Force Monitor®, Perimed® laser-doppler et Endopat2000®. Le traitement a été poursuivi pendant 12 semaines et les explorations ont été répétées sur 2 journées organisées de façon identique. Seule une charge en glucose devrait être effectuée en supplément le dernier jour, le traitement étant arrêté depuis la veille au soir, pour évaluer si l'intolérance au glucose persiste ou non.

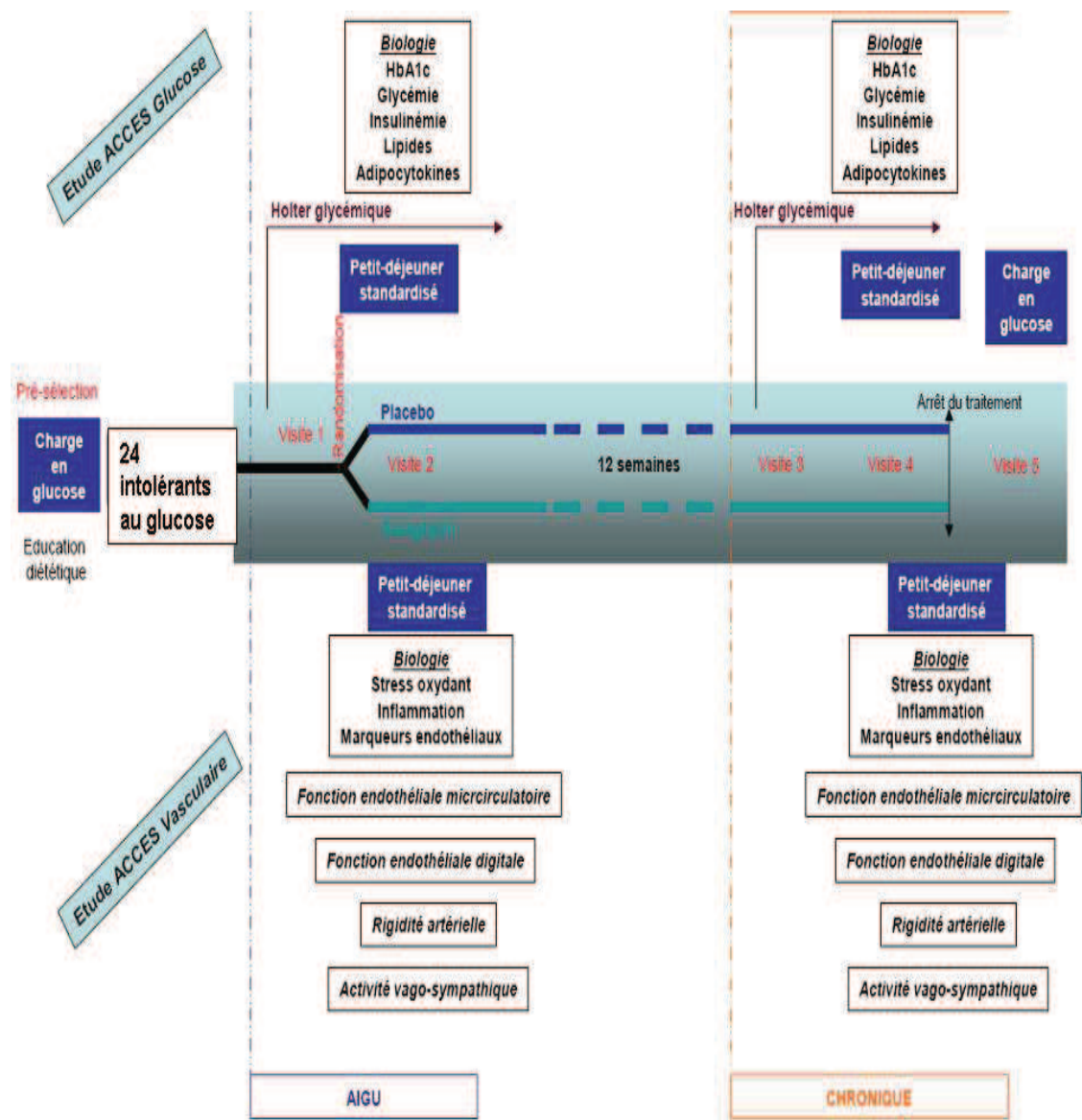


Figure 73: Schéma de l'étude ACCES

L'aveugle de l'étude n'a pas encore été levé et les résultats sont en cours d'analyse.

## 6 Références

1. Nichols WW and O.R. MF., *McDonald's Blood Flow in Arteries. Theoretical, Experimental and Clinical Principles*, 1998, 4th edition.
2. Jaiswal, M., et al., *Reduced heart rate variability among youth with type 1 diabetes: the SEARCH CVD study*. *Diabetes Care*, 2013, 36(1): p. 157-62.
3. Berne, C., J. Fagius, and F. Niklasson, *Sympathetic response to oral carbohydrate administration. Evidence from microelectrode nerve recordings*. *Journal of Clinical Investigation*, 1989, 84(5): p. 1403-1409.
4. Kollias, A., et al., *Association of Central Versus Brachial Blood Pressure With Target-Organ Damage: Systematic Review and Meta-Analysis*. *Hypertension*, 2016, 67(1): p. 183-90.
5. Westerbacka, J., et al., *Diminished wave reflection in the aorta. A novel physiological action of insulin on large blood vessels*. *Hypertension*, 1999, 33(5): p. 1118-22.
6. Davies, J.E., et al., *Excess pressure integral predicts cardiovascular events independent of other risk factors in the conduit artery functional evaluation substudy of Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial*. *Hypertension*, 2014, 64(1): p. 60-8.
7. G-TNDO., *Elaboration de la loi relative à la politique de santé publique. Analyse des connaissances disponibles sur des problèmes de santé sélectionnés, leurs déterminants, et les stratégies de santé publique*. Paris, direction générale de la santé, 2003.
8. Parra-Bonilla, G., et al., *Critical role for lactate dehydrogenase A in aerobic glycolysis that sustains pulmonary microvascular endothelial cell proliferation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(4): p. L513-22.
9. Flammer, A.J., et al., *The assessment of endothelial function: from research into clinical practice*. *Circulation*, 2012, 126(6): p. 753-67.
10. Mertens, S., et al., *Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia*. *Am J Physiol*, 1990, 258(3 Pt 2): p. H689-94.
11. Dagher, Z., et al., *Acute regulation of fatty acid oxidation and amp-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells*. *Circ Res*, 2001, 88(12): p. 1276-82.
12. Eelen, G., et al., *Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature*. *Circ Res*, 2015, 116(7): p. 1231-44.
13. Riganti, C., et al., *The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate*. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(3): p. 421-36.
14. Slawson, C., R.J. Copeland, and G.W. Hart, *O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer?* *Trends in Biochemical Sciences*, 2010, 35(10): p. 547-555.
15. Zhang, Z., et al., *High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): p. 40042-7.
16. De Bock, K., et al., *Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting*. *Cell*, 2013, 154(3): p. 651-63.
17. Mishra, R.C., et al., *Nitric oxide synthase inhibition promotes endothelium-dependent vasodilatation and the antihypertensive effect of L-serine*. *Hypertension*, 2008, 51(3): p. 791-6.
18. Merchan, J.R., et al., *Antiangiogenic Activity of 2-Deoxy-D-Glucose*. *PLoS One*, 2010, 5(10): p. e13699.

19. Steil, G.M., et al., *Transendothelial insulin transport is not saturable in vivo. No evidence for a receptor-mediated process.* *J Clin Invest*, 1996. 97(6): p. 1497-503.
20. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds.* *Circ Res*, 2007. 100(2): p. 174-90.
21. Kubota, T., N. Kubota, and T. Kadowaki, *The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism.* *Rev Endocr Metab Disord*, 2013. 14(2): p. 207-16.
22. Pansuria, M., *Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis.* *Frontiers in Bioscience*, 2012. S4(1): p. 916.
23. Kim, J.A., *Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Molecular and Pathophysiological Mechanisms.* *Circulation*, 2006. 113(15): p. 1888-1904.
24. Nolan, C.J., et al., *Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: implications for the management of subsets of type 2 diabetes.* *Diabetes*, 2015. 64(3): p. 673-86.
25. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.* *N Engl J Med*, 1986. 315(17): p. 1046-51.
26. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.* *Lancet*, 1992. 340(8828): p. 1111-5.
27. Joannides, R., et al., *Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo.* *Circulation*, 1995. 91(5): p. 1314-9.
28. Lieberman, E.H., et al., *Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease.* *Am J Cardiol*, 1996. 78(11): p. 1210-4.
29. Parker, B.A., et al., *Heterogenous vasodilator pathways underlie flow-mediated dilation in men and women.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 301(3): p. H1118-26.
30. Anderson, T.J., et al., *Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation.* *J Am Coll Cardiol*, 1995. 26(5): p. 1235-41.
31. Blankenberg, S., S. Barbaux, and L. Tiret, *Adhesion molecules and atherosclerosis.* *Atherosclerosis*, 2003. 170(2): p. 191-203.
32. NCEP., *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III).* *Jama*, 2001. 285(19): p. 2486-97.
33. Nitenberg, A., et al., *Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function.* *Diabetes*, 1993. 42(7): p. 1017-25.
34. Henry, R.M., et al., *Type 2 diabetes is associated with impaired endothelium-dependent, flow-mediated dilation, but impaired glucose metabolism is not; The Hoorn Study.* *Atherosclerosis*, 2004. 174(1): p. 49-56.
35. Schachinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease.* *Circulation*, 2000. 101(16): p. 1899-906.
36. Prior, J.O., et al., *Coronary circulatory dysfunction in insulin resistance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus.* *Circulation*, 2005. 111(18): p. 2291-8.
37. Sorensen, K.E., et al., *Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level.* *J Clin Invest*, 1994. 93(1): p. 50-5.
38. Celermajer, D.S., et al., *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction.* *J Am Coll Cardiol*, 1994. 24(6): p. 1468-74.

39. Celermajer, D.S., et al., *Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults.* *Circulation*, 1993. 88(5 Pt 1): p. 2149-55.
40. G, R., *Patient's non-adherence and doctors' clinical inertia: the two faces of medical irrationality.* *Diabetes Management.*, 2015(5): p. 167-180.
41. Koh, K.K., et al., *Distinct vascular and metabolic effects of different classes of anti-hypertensive drugs.* *Int J Cardiol*, 2008.
42. Dogra, G.K., et al., *Statin therapy improves brachial artery vasodilator function in patients with Type 1 diabetes and microalbuminuria.* *Diabet Med*, 2005. 22(3): p. 239-42.
43. Viridis, A., et al., *Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocysteinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension.* *Journal of the American College of Cardiology*, 2001. 38(4): p. 1106-1115.
44. Tawakol, A., et al., *Homocysteine impairs coronary microvascular dilator function in humans.* *Journal of the American College of Cardiology*, 2002. 40(6): p. 1051-1058.
45. Shechter, M., et al., *Oral Magnesium Therapy Improves Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease.* *Circulation*, 2000. 102(19): p. 2353-2358.
46. Flammer, A.J., et al., *Effect of atazanavir versus other protease inhibitor-containing antiretroviral therapy on endothelial function in HIV-infected persons: randomised controlled trial.* *Heart*, 2008. 95(5): p. 385-390.
47. Flammer, A.J., et al., *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Improves Vascular Function in Rheumatoid Arthritis.* *Circulation*, 2008. 117(17): p. 2262-2269.
48. Charakida, M., *Endothelial Dysfunction in Childhood Infection.* *Circulation*, 2005. 111(13): p. 1660-1665.
49. Sena, C.M., A.M. Pereira, and R. Seica, *Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2013. 1832(12): p. 2216-2231.
50. Jansson, P.A., *Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes.* *J Intern Med*, 2007. 262(2): p. 173-183.
51. Paneni, F., et al., *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I.* *Eur Heart J*, 2013. 34(31): p. 2436-2443.
52. Fadini, G.P., et al., *Optimized glycaemic control achieved with add-on basal insulin therapy improves indexes of endothelial damage and regeneration in type 2 diabetic patients with macroangiopathy: a randomized crossover trial comparing detemir versus glargine.* *Diabetes Obes Metab*, 2011. 13(8): p. 718-25.
53. Nitenberg, A., D. Chemla, and I. Antony, *Epicardial coronary artery constriction to cold pressor test is predictive of cardiovascular events in hypertensive patients with angiographically normal coronary arteries and without other major coronary risk factor.* *Atherosclerosis*, 2004. 173(1): p. 115-23.
54. Halcox, J.P., et al., *Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction.* *Circulation*, 2002. 106(6): p. 653-8.
55. Graham, I., et al., *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts).* *Eur Heart J*, 2007. 28(19): p. 2375-2414.
56. Greenland, P., et al., *2010 ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.* *Circulation*, 2010. 122(25): p. e584-e636.

57. Puri, R., et al., *Coronary 2-adrenoreceptors mediate endothelium-dependent vasoreactivity in humans: novel insights from an in vivo intravascular ultrasound study*. *Eur Heart J*, 2011. 33(4): p. 495-504.
58. Kitta, Y., et al., *Persistent Impairment of Endothelial Vasomotor Function Has a Negative Impact on Outcome in Patients With Coronary Artery Disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. 53(4): p. 323-330.
59. Modena, M.G., et al., *Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 40(3): p. 505-10.
60. Ganz, P. and P.Y. Hsue, *Individualized Approach to the Management of Coronary Heart Disease*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009. 53(4): p. 331-333.
61. Trochu, J.N., et al., *Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Regulation of Cardiac Oxygen Metabolism : Implications in Health and Disease*. *Circ Res*, 2000. 87(12): p. 1108-1117.
62. Flammer, A.J., et al., *The assessment of endothelial function: From research into clinical practice*. *Circulation*, 2012. 126(6): p. 753-767.
63. Lavi, S., et al., *Smoking Is Associated With Epicardial Coronary Endothelial Dysfunction and Elevated White Blood Cell Count in Patients With Chest Pain and Early Coronary Artery Disease*. *Circulation*, 2007. 115(20): p. 2621-2627.
64. Hamburg, N.M., et al., *Relation of Brachial and Digital Measures of Vascular Function in the Community: The Framingham Heart Study*. *Hypertension*, 2011. 57(3): p. 390-396.
65. Braverman, I.M., *The cutaneous microcirculation*. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 2000. 5(1): p. 3-9.
66. Brengelmann, G.L. and M.V. Savage, *Temperature regulation in the neutral zone*. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. 813: p. 39-50.
67. Charkoudian, N. and J.M. Johnson, *Reflex control of cutaneous vasoconstrictor system is reset by exogenous female reproductive hormones*. *J Appl Physiol* (1985), 1999. 87(1): p. 381-5.
68. Stephens, D.P., et al., *Nonnoradrenergic mechanism of reflex cutaneous vasoconstriction in men*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(4): p. H1496-504.
69. Stephens, D.P., et al., *Neuropeptide Y antagonism reduces reflex cutaneous vasoconstriction in humans*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(3): p. H1404-9.
70. Lang, J.A., et al., *Reflex vasoconstriction in aged human skin increasingly relies on Rho kinase-dependent mechanisms during whole body cooling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009. 297(5): p. H1792-7.
71. Grant RT, H.H., *Further observations on the vascular responses of the human limb to body warming: evidence for sympathetic vasodilator nerves in the normal subject*. *Clin Sci (Lond)*, 1938. 3: p. 273-285.
72. Kolka, M.A. and L.A. Stephenson, *Cutaneous blood flow and local sweating after systemic atropine administration*. *Pflugers Arch*, 1987. 410(4-5): p. 524-9.
73. Kellogg, D.L., Jr., et al., *Bradykinin does not mediate cutaneous active vasodilation during heat stress in humans*. 1985). 2002. 93(4): p. 1215-21.
74. Kellogg, D.L., Jr., et al., *Thermoregulatory reflexes and cutaneous active vasodilation during heat stress in hypertensive humans*. *J Appl Physiol* (1985), 1998. 85(1): p. 175-80.
75. Charkoudian, N., *Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans*. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 2010. 109(4): p. 1221-8.

76. Kellogg, D.L., Jr., J.L. Zhao, and Y. Wu, *Neuronal nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo*. *J Physiol*, 2008. 586(3): p. 847-57.
77. Bennett, L.A., et al., *Evidence for a role for vasoactive intestinal peptide in active vasodilation in the cutaneous vasculature of humans*. *J Physiol*, 2003. 552(Pt 1): p. 223-32.
78. Wilkins, B.W., et al., *Vasoactive intestinal peptide fragment VIP10-28 and active vasodilation in human skin*. *J Appl Physiol* (1985), 2005. 99(6): p. 2294-301.
79. Wong, B.J. and C.T. Minson, *Neurokinin-1 receptor desensitization attenuates cutaneous active vasodilation in humans*. *J Physiol*, 2006. 577(Pt 3): p. 1043-51.
80. Wong, B.J., B.W. Wilkins, and C.T. Minson, *H1 but not H2 histamine receptor activation contributes to the rise in skin blood flow during whole body heating in humans*. *J Physiol*, 2004. 560(Pt 3): p. 941-8. Epub 2004 Sep 16.
81. McCord, G.R., J.L. Cracowski, and C.T. Minson, *Prostanoids contribute to cutaneous active vasodilation in humans*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. 291(3): p. R596-602.
82. Mahe, G., et al., *Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2012. 5(1): p. 155-63.
83. O'Doherty, J., et al., *Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration*. *J Biomed Opt*, 2009. 14(3): p. 034025.
84. Tee, G.B., et al., *Dependence of human forearm skin postocclusive reactive hyperemia on occlusion time*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004. 50(1): p. 73-8.
85. Cracowski, J.L., et al., *Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans*. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(9): p. 503-8.
86. Morales, F., et al., *How to assess post-occlusive reactive hyperaemia by means of laser Doppler perfusion monitoring: Application of a standardised protocol to patients with peripheral arterial obstructive disease*. *Microvascular research*, 2005. 69(1-2): p. 17-23.
87. Wong, B.J., et al., *Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation*. *Journal of Applied Physiology*, 2003. 95(2): p. 504-510.
88. Zhao, J.L., *Bioactive nitric oxide concentration does not increase during reactive hyperemia in human skin*. *Journal of Applied Physiology*, 2004. 96(2): p. 628-632.
89. Binggeli, C., et al., *Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. 42(1): p. 71-77.
90. Charkoudian, N., *Skin Blood Flow in Adult Human Thermoregulation: How It Works, When It Does Not, and Why*. *Mayo Clinic Proceedings*, 2003. 78(5): p. 603-612.
91. Minson, C.T., L.T. Berry, and M.J. Joyner, *Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating*. *J Appl Physiol* (1985), 2001. 91(4): p. 1619-26.
92. Kellogg, D.L., Jr., et al., *Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans*. *J Appl Physiol* (1985), 1999. 86(4): p. 1185-90.
93. Golay, S., et al., *Local heating of human skin causes hyperemia without mediation by muscarinic cholinergic receptors or prostanoids*. 1985). 2004. 97(5): p. 1781-6. Epub 2004 Jul 9.
94. Khan, F., et al., *Impaired skin microvascular function in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 2000. 23(2): p. 215-220.
95. Wigington, G., B. Ngo, and M. Rendell, *Skin Blood Flow in Diabetic Dermopathy*. *Arch Dermatol*, 2004. 140(10).

96. Thompson-Torgerson, C.S., et al., *Cold-induced cutaneous vasoconstriction is mediated by Rho kinase in vivo in human skin*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. 292(4): p. H1700-5. Epub 2006 Dec 15.
97. Hodges, G.J., et al., *The involvement of nitric oxide in the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling in humans*. *J Physiol*, 2006. 574(Pt 3): p. 849-57.
98. Pergola, P.E., et al., *Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin*. *Am J Physiol*, 1993. 265(3 Pt 2): p. H785-92.
99. Tee, G.B.Y., et al., *Dependence of human forearm skin postocclusive reactive hyperemia on occlusion time*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2004. 50(1): p. 73-78.
100. Lorenzo, S. and C.T. Minson, *Human cutaneous reactive hyperaemia: role of BKCa channels and sensory nerves*. *J Physiol*, 2007. 585(Pt 1): p. 295-303.
101. Fromy, B., et al., *Aging-associated sensory neuropathy alters pressure-induced vasodilation in humans*. *J Invest Dermatol*, 2010. 130(3): p. 849-55.
102. Fromy, B., P. Abraham, and J.L. Saumet, *Progressive calibrated pressure device to measure cutaneous blood flow changes to external pressure strain*. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2000. 5(2): p. 198-203.
103. Beed, M., et al., *Transient hyperaemic response to assess skin vascular reactivity: effects of heat and iontophoresed norepinephrine*. *Br J Anaesth*, 2009. 102(2): p. 205-9.
104. Wilkins, B.W., et al., *Nitric oxide is not permissive for cutaneous active vasodilatation in humans*. *J Physiology*, 2003. 548(3): p. 963-969.
105. Ashok, V. and N. Kumar, *Determination of blood glucose concentration by using wavelet transform and neural networks*. *Iran J Med Sci*, 2013. 38(1): p. 51-6.
106. Stefanovska, A., M. Bracic, and H.D. Kvernmo, *Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique*. *IEEE Trans Biomed Eng.*, 1999. 46(10): p. 1230-9.
107. Kvandal, P., et al., *Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin*. *Microvasc Res*, 2006. 72(3): p. 120-7.
108. Durand, S., et al., *Prostaglandins participate in the late phase of the vascular response to acetylcholine iontophoresis in humans*. *J Physiol*, 2004. 561(Pt 3): p. 811-9.
109. Gaubert, M.L., et al., *Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice*. *J Physiol*, 2007. 585(Pt 2): p. 617-26.
110. Morris, S.J. and A.C. Shore, *Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms*. *J Physiol*, 1996. 496 ( Pt 2): p. 531-42.
111. Newton, D.J., F. Khan, and J.J. Belch, *Assessment of microvascular endothelial function in human skin*. *Clin Sci (Lond)*, 2001. 101(6): p. 567-72.
112. Brown, H., I.K. Moppett, and R.P. Mahajan, *Transient hyperaemic response to assess vascular reactivity of skin: effect of locally iontophoresed acetylcholine, bradykinin, epinephrine and phenylephrine*. *Br J Anaesth*, 2003. 90(4): p. 446-51.
113. Saumet, J.L., P. Abraham, and A. Jardel, *Cutaneous vasodilation induced by local warming, sodium nitroprusside, and bretylium iontophoresis on the hand*. *Microvasc Res*, 1998. 56(3): p. 212-7.
114. Johnson, J.M., et al., *Sympathetic, sensory, and nonneuronal contributions to the cutaneous vasoconstrictor response to local cooling*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2005. 288(4): p. H1573-9.
115. Delaney, C., J. Shaw, and T. Day, *Acute, local effects of iontophoresed insulin and C-peptide on cutaneous microvascular function in Type 1 diabetes mellitus*. *Diabet Med*, 2004. 21(5): p. 428-33.



116. Rossi, M., et al., *Skin microcirculatory effect of exogenous calcitonin gene-related peptide (CGRP) evaluated by laser Doppler flowmetry coupled with iontophoresis in healthy subjects*. *Microvascular research*, 2007, 73(2): p. 124-30.
117. Edvinsson, M.L. and L. Edvinsson, *Comparison of CGRP and NO responses in the human peripheral microcirculation of migraine and control subjects*. *Cephalalgia*, 2008, 28(5): p. 563-6.
118. Tartas, M., et al., *Cathodal current-induced vasodilation to single application and the amplified response to repeated application in humans rely on aspirin-sensitive mechanisms*. *J Appl Physiol* (1985), 2005, 99(4): p. 1538-44.
119. Durand, S., et al., *Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms*. *J Vasc Res*, 2002, 39(1): p. 59-71.
120. Leroy, T., et al., *Comparison of the effects of cetirizine and ebastine on the skin response to histamine iontophoresis monitored with laser Doppler flowmetry*. *Dermatology*, 1998, 197(2): p. 146-51.
121. Jones, B.L., et al., *Assessment of histamine pharmacodynamics by microvasculature response of histamine using histamine iontophoresis laser Doppler flowmetry*. *J Clin Pharmacol*, 2009, 49(5): p. 600-5.
122. Rossi, M., S. Maurizio, and A. Carpi, *Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects*. *Microvasc Res*, 2005, 70(1-2): p. 17-22.
123. Sauvet, F., et al., *Acetylcholine chloride as a potential source of variability in the study of cutaneous vascular function in man*. *Microvasc Res*, 2011, 82(2): p. 190-7.
124. Noon, J.P., et al., *Studies with iontophoretic administration of drugs to human dermal vessels in vivo: cholinergic vasodilatation is mediated by dilator prostanoids rather than nitric oxide*. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, 45(6): p. 545-50.
125. Kubli, S., et al., *Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 36(5): p. 640-8.
126. Boignard, A., et al., *Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon*. *Arthritis Res Ther.*, 2005, 7(5): p. R1103-12. Epub 2005 Jul 19.
127. Verma, S., M.R. Buchanan, and T.J. Anderson, *Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease*. *Circulation*, 2003, 108(17): p. 2054-9.
128. Antony, I., et al., *Coronary vasodilator reserve in untreated and treated hypertensive patients with and without left ventricular hypertrophy*. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 22(2): p. 514-20.
129. Cosson, E., *La plaque d'athérome non compliquée chez le diabétique : les différents acteurs*. 14e symposium international de diabétologie, ed. Elsevier 2001, Paris.
130. Verma, S., *Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease*. *Circulation*, 2003, 108(17): p. 2054-2059.
131. Lerman, A. and A.M. Zeiher, *Endothelial function: cardiac events*. *Circulation*, 2005, 111(3): p. 363-8.
132. Czernichow, S., et al., *Macrovascular and microvascular dysfunction in the metabolic syndrome*. *Hypertens Res*, 2010.
133. de Jongh, R.T., et al., *Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance*. *Circulation*, 2004, 109(21): p. 2529-35.
134. Debbabi, H., et al., *Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients*. *Am J Hypertens*, 2006, 19(5): p. 477-83.
135. Czernichow, S., et al., *Microvascular dysfunction in healthy insulin-sensitive overweight individuals*. *J Hypertens*, 2010, 28(2): p. 325-32.
136. Rossi, M., et al., *The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? Biomed Pharmacother*, 2006, 60(8): p. 437-42.

137. Khan, F., et al., *Relationship between peripheral and coronary function using laser Doppler imaging and transthoracic echocardiography*. *Clin Sci (Lond)*. 2008. 115(9): p. 295-300. doi: 10.1042/CS20070431.
138. Sax, F.L., et al., *Impaired forearm vasodilator reserve in patients with microvascular angina. Evidence of a generalized disorder of vascular function?* *N Engl J Med*, 1987. 317(22): p. 1366-70.
139. Hirata, K., M. Kawakami, and M.F. O'Rourke, *Pulse wave analysis and pulse wave velocity: a review of blood pressure interpretation 100 years after Korotkov*. *Circ J*, 2006. 70(10): p. 1231-9.
140. Laurent, S., et al., *Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications*. *Eur Heart J*, 2006. 27(21): p. 2588-605.
141. Hashimoto, J., et al., *Different role of wave reflection magnitude and timing on left ventricular mass reduction during antihypertensive treatment*. *Journal of hypertension*, 2008. 26(5): p. 1017-24.
142. Wilkinson, L.B., et al., *Pressure Amplification Explains Why Pulse Pressure Is Unrelated to Risk in Young Subjects*. *Hypertension*, 2001. 38(6): p. 1461-1466.
143. Agabiti-Rosei, E., et al., *Central blood pressure measurements and antihypertensive therapy: A consensus document*. *Hypertension*, 2007. 50(1): p. 154-160.
144. Roman, M.J., et al., *Central pressure more strongly relates to vascular disease and outcome than does brachial pressure: the Strong Heart Study*. *Hypertension*, 2007. 50(1): p. 197-203.
145. Safar, M.E., et al., *Central pulse pressure and mortality in end-stage renal disease*. *Hypertension*, 2002. 39(3): p. 735-8.
146. Pauca, A.L., et al., *Does radial artery pressure accurately reflect aortic pressure?* *Chest*, 1992. 102(4): p. 1193-8.
147. Benetos, A., et al., *Pulse Pressure Amplification. A Mechanical Biomarker of Cardiovascular Risk*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010. 55(10): p. 1032-1037.
148. Avolio, A.P., et al., *Role of pulse pressure amplification in arterial hypertension: Experts' opinion and review of the data*. *Hypertension*, 2009. 54(2): p. 375-383.
149. Laurent, S., P. Boutouyrie, and P. Lacolley, *Structural and genetic bases of arterial stiffness*. *Hypertension*, 2005. 45(6): p. 1050-5.
150. Wilkinson, L.B., et al., *Heart rate dependency of pulse pressure amplification and arterial stiffness*. *Am J Hypertens*, 2002. 15(1 Pt 1): p. 24-30.
151. Vyas, M., et al., *Augmentation index and central aortic stiffness in middle-aged to elderly individuals*. *Am J Hypertens*, 2007. 20(6): p. 642-7.
152. Proterogerou, A.D. and M.E. Safar, *Dissociation between central augmentation index and carotid-femoral pulse-wave velocity: when and why?* *Am J Hypertens.*, 2007. 20(6): p. 648-9.
153. Lacy, P.S., et al., *Increased pulse wave velocity is not associated with elevated augmentation index in patients with diabetes*. *J Hypertens.*, 2004. 22(10): p. 1937-44.
154. McEniery, C.M., et al., *Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT)*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(9): p. 1753-60.
155. Vlachopoulos, C., et al., *Acute systemic inflammation increases arterial stiffness and decreases wave reflections in healthy individuals*. *Circulation*, 2005. 112(14): p. 2193-200.
156. Proterogerou, A.D., et al., *Gender influence on metabolic syndrome's effects on arterial stiffness and pressure wave reflections in treated hypertensive subjects*. *Atherosclerosis*, 2007. 193(1): p. 151-8.
157. Lemogoun, D., et al., *Validity of pulse pressure and augmentation index as surrogate measures of arterial stiffness during beta-adrenergic stimulation*. *J Hypertens.*, 2004. 22(3): p. 511-7.

158. Mitchell, G.F., et al., *Changes in aortic stiffness and augmentation index after acute converting enzyme or vasopeptidase inhibition*. *Hypertension*, 2005, 46(5): p. 1111-7.
159. Sakurai, M., et al., *The relationship between aortic augmentation index and pulse wave velocity: an invasive study*. *Journal of hypertension*, 2007, 25(2): p. 391-397.
160. Greenwald, S.E., A.C. Carter, and C.L. Berry, *Effect of age on the in vitro reflection coefficient of the aortoiliac bifurcation in humans*. *Circulation*, 1990, 82(1): p. 114-23.
161. *Standards of medical care in diabetes--2013*. *Diabetes Care*, 2013, 36 Suppl 1: p. S11-66.
162. Albaladejo, P., et al., *Association between 24-hour ambulatory heart rate and arterial stiffness*. *J Hum Hypertens*, 2000, 14(2): p. 137-41.
163. Czernichow, S., et al., *Metabolic Syndrome in Relation to Structure and Function of Large Arteries: A Predominant Effect of Blood Pressure. A Report From the SUIVIM4X Vascular Study*. *Am J Hypertens*, 2005, 18(9): p. 1154-1160.
164. Ferreira, L., et al., *The metabolic syndrome, cardiopulmonary fitness, and subcutaneous trunk fat as independent determinants of arterial stiffness: the Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study*. *Arch Intern Med*, 2005, 165(8): p. 875-82.
165. Schram, M.T., et al., *Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the Hoorn Study*. *Hypertension*, 2004, 43(2): p. 176-81.
166. Wilkinson, I.B., *Nitric Oxide Regulates Local Arterial Distensibility In Vivo*. *Circulation*, 2002, 105(2): p. 213-217.
167. Schram, M.T., et al., *Advanced glycation end products are associated with pulse pressure in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study*. *Hypertension*, 2005, 46(1): p. 232-7.
168. Kool, M.J., et al., *Short- and long-term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers*. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 22(7): p. 1881-6.
169. Tryfonopoulos, D., et al., *Arterial stiffness in Type 1 diabetes mellitus is aggravated by autoimmune thyroid disease*. *J Endocrinol Invest*, 2005, 28(9): p. 616-622.
170. Stakos, D.A., *Cardiovascular Effects of Type 1 Diabetes Mellitus in Children*. *Angiology*, 2005, 56(3): p. 311-317.
171. Atabek, M.E., et al., *Arterial wall thickening and stiffening in children and adolescents with type 1 diabetes*. *Diabetes research and clinical practice*, 2006, 74(1): p. 33-40.
172. Ahlgren, R., et al., *Increased aortic stiffness is persistent in type 1 diabetic women: a follow-up study*. *Diabetologia*, 2005, 48(4): p. 780-783.
173. Wilkinson, I.B., *Increased augmentation index and systolic stress in type 1 diabetes mellitus*. *QJM*, 2000, 93(7): p. 441-448.
174. Parikh, A., et al., *Carotid artery distensibility and cardiac function in adolescents with type 1 diabetes*. *J Pediatr*, 2000, 137(4): p. 465-469.
175. Haller, M.J., et al., *Radial Artery Tonometry Demonstrates Arterial Stiffness in Children With Type 1 Diabetes*. *Diabetes Care*, 2004, 27(12): p. 2911-2917.
176. Giannattasio, C., et al., *Early impairment of large artery structure and function in Type I diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 1999, 42(8): p. 987-994.
177. Giannattasio, C., et al., *Progression of large artery structural and functional alterations in Type I diabetes*. *Diabetologia*, 2001, 44(2): p. 203-208.
178. Brooks, B., L. Molyneaux, and D.K. Yue, *Augmentation of central arterial pressure in type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 1999, 22(10): p. 1722-1727.
179. Ahlgren, A.R., et al., *Female gender increases stiffness of elastic but not of muscular arteries in type I diabetic patients*. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2002, 22(6): p. 409-415.

180. Lambert, J., et al., *Carotid artery stiffness is increased in microalbuminuric IDDM patients*. *Diabetes Care*, 1998, 21(1): p. 99-103.
181. Ronnback, M., et al., *Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes*. *Circulation*, 2004, 110(9): p. 1076-82.
182. Stehouwer, C.D., R.M. Henry, and I. Ferreira, *Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease*. *Diabetologia*, 2008, 51(4): p. 527-39.
183. van Popele, N.M., et al., *Variables of the insulin resistance syndrome are associated with reduced arterial distensibility in healthy non-diabetic middle-aged women*. *Diabetologia*, 2000, 43(5): p. 665-672.
184. Nakanishi, N., K. Suzuki, and K. Tatara, *Clustered Features of the Metabolic Syndrome and the Risk for Increased Aortic Pulse Wave Velocity in Middle-aged Japanese Men*. *Angiology*, 2003, 54(5): p. 551-559.
185. Choi, K.M., et al., *Relationship between brachial-ankle pulse wave velocity and cardiovascular risk factors of the metabolic syndrome*. *Diabetes research and clinical practice*, 2004, 66(1): p. 57-61.
186. Scuteri, A., et al., *Metabolic syndrome amplifies the age-associated increases in vascular thickness and stiffness*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004, 43(8): p. 1388-1395.
187. Iannuzzi, A., et al., *Carotid Artery Stiffness in Obese Children With the Metabolic Syndrome*. *Am J Cardiol*, 2006, 97(4): p. 528-531.
188. Li, S., et al., *Influence of metabolic syndrome on arterial stiffness and its age-related change in young adults: the Bogalusa Heart Study*. *Atherosclerosis*, 2005, 180(2): p. 349-354.
189. Ferreira, I., et al., *Clustering of metabolic syndrome risk factors and arterial stiffness in young adults: the Northern Ireland Young Hearts Project*. *Journal of hypertension*, 2007, 25(5): p. 1009-1020.
190. Safar, M.E., et al., *Metabolic Syndrome and Age-Related Progression of Aortic Stiffness*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 47(1): p. 72-75.
191. Tomiyama, H., et al., *The Effects of Changes in the Metabolic Syndrome Detection Status on Arterial Stiffening: A Prospective Study*. *Hypertens Res*, 2006, 29(9): p. 673-678.
192. Taniwaki, H., et al., *Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes*. *Vessel wall properties in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 1999, 22(11): p. 1851-1857.
193. Aoun, S., et al., *Diabetes mellitus and renal failure: effects on large artery stiffness*. *J Hum Hypertens*, 2001, 15(10): p. 693-700.
194. Brooks, B.A., L.M. Molyneaux, and D.K. Yue, *Augmentation of central arterial pressure in Type 2 diabetes*. *Diabet Med*, 2001, 18(5): p. 374-380.
195. Ravikumar, R., et al., *Comparison of carotid intima-media thickness, arterial stiffness, and brachial artery flow mediated dilatation in diabetic and nondiabetic subjects (The Chennai Urban Population Study [CUPS-9])*. *Am J Cardiol*, 2002, 90(7): p. 702-707.
196. Cameron, J.D., et al., *The Aging of Elastic and Muscular Arteries: A comparison of diabetic and nondiabetic subjects*. *Diabetes Care*, 2003, 26(7): p. 2133-2138.
197. Fukui, M., et al., *Augmentation of central arterial pressure as a marker of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes research and clinical practice*, 2003, 59(2): p. 153-161.
198. Henry, R.M.A., *Arterial Stiffness Increases With Deteriorating Glucose Tolerance Status: The Hoorn Study*. *Circulation*, 2003, 107(16): p. 2089-2095.
199. Kimoto, E., et al., *Preferential Stiffening of Central Over Peripheral Arteries in Type 2 Diabetes*. *Diabetes*, 2003, 52(2): p. 448-452.

200. Chen, Q., et al., *Arterial stiffness is elevated in normotensive type 2 diabetic patients with peripheral neuropathy*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 2015, 25(11): p. 1041-9. doi: 10.1016/j.numecd.2015.08.001. Epub 2015 Aug 12.
201. Ohnishi, H., et al., *Pulse Wave Velocity as an Indicator of Atherosclerosis in Impaired Fasting Glucose: The Tanno and Sobetsu Study*. *Diabetes Care*, 2003, 26(2): p. 437-440.
202. Van Popele, N.M., et al., *Impaired Fasting Glucose Is Associated with Increased Arterial Stiffness in Elderly People without Diabetes Mellitus: The Rotterdam Study*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2006, 54(3): p. 397-404.
203. Haffner, S.M., et al., *Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?* *Jama*, 1990, 263(21): p. 2893-8.
204. Hermans, M.M., et al., *Estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion are independently associated with greater arterial stiffness: the Hoorn Study*. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(6): p. 1942-52.
205. Rema, M., et al., *Association of carotid intima-media thickness and arterial stiffness with diabetic retinopathy: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-2)*. *Diabetes Care*, 2004, 27(8): p. 1962-7.
206. Yokoyama, H., et al., *Subclinical atherosclerosis is increased in type 2 diabetic patients with microalbuminuria evaluated by intima-media thickness and pulse wave velocity*. *Kidney Int*, 2004, 66(1): p. 448-54.
207. Knudsen, S.T., et al., *Pulse pressure and diurnal blood pressure variation: association with micro- and macrovascular complications in type 2 diabetes*. *Am J Hypertens*, 2002, 15(3): p. 244-50.
208. Cockcroft, J.R., et al., *Pulse pressure predicts cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Am J Hypertens*, 2005, 18(11): p. 1463-7; discussion 1468-9.
209. Aatola, H., et al., *Lifetime fruit and vegetable consumption and arterial pulse wave velocity in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. *Circulation*, 2010, 122(24): p. 2521-8.
210. Lynn, A., et al., *Effects of pomegranate juice supplementation on pulse wave velocity and blood pressure in healthy young and middle-aged men and women*. *Plant Foods Hum Nutr*, 2012, 67(3): p. 309-14.
211. Dohadwala, M.M., et al., *Effects of cranberry juice consumption on vascular function in patients with coronary artery disease*. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(5): p. 934-40.
212. Figueroa, A., et al., *Effects of milk proteins and combined exercise training on aortic hemodynamics and arterial stiffness in young obese women with high blood pressure*. *Am J Hypertens*, 2014, 27(3): p. 338-44.
213. Fahs, C.A., et al., *The effect of acute fish-oil supplementation on endothelial function and arterial stiffness following a high-fat meal*. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 2010, 35(3): p. 294-302.
214. Hill, A.M., et al., *Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors*. *Am J Clin Nutr*, 2007, 85(5): p. 1267-74.
215. McVeigh, G.E., et al., *Fish oil improves arterial compliance in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994, 14(9): p. 1425-1429.
216. Theobald, H.E., et al., *Low-dose docosahexaenoic acid lowers diastolic blood pressure in middle-aged men and women*. *J Nutr*, 2007, 137(4): p. 973-8.
217. Satoh, N., et al., *Highly purified eicosapentaenoic acid reduces cardio-ankle vascular index in association with decreased serum amyloid A-LDL in metabolic syndrome*. *Hypertens Res*, 2009, 32(11): p. 1004-1008.

218. Sjöberg, N.J., et al., *Dose-dependent increases in heart rate variability and arterial compliance in overweight and obese adults with DHA-rich fish oil supplementation.* *Br J Nutr.* 2009. 103(02): p. 243.
219. Wang, S., et al., *Fish oil supplementation improves large arterial elasticity in overweight hypertensive patients.* *Eur J Clin Nutr.* 2007. 62(12): p. 1426-1431.
220. Tomiyama, H., et al., *Do Eicosapentaenoic Acid Supplements Attenuate Age-Related Increases in Arterial Stiffness in Patients with Dyslipidemia?: A Preliminary Study.* *Hypertens Res.* 2005. 28(8): p. 651-655.
221. Mita, T., et al., *Eicosapentaenoic acid reduces the progression of carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes.* *Atherosclerosis.* 2007. 191(1): p. 162-167.
222. Jauhainen, T., et al., *Long-term intervention with Lactobacillus helveticus fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects.* *Eur J Clin Nutr.* 2010. 64(4): p. 424-431.
223. Jauhainen, T., et al., *Lactobacillus helveticus fermented milk reduces arterial stiffness in hypertensive subjects.* *International Dairy Journal.* 2007. 17(10): p. 1209-1211.
224. Pase, M.P., N.A. Grima, and J. Sarris, *The effects of dietary and nutrient interventions on arterial stiffness: a systematic review.* *Am J Clin Nutr.* 2011. 93(2): p. 446-54.
225. Gijssbers, L., et al., *Effects of sodium and potassium supplementation on blood pressure and arterial stiffness: a fully controlled dietary intervention study.* *J Hum Hypertens.* 2015.
226. He, F.J., et al., *Effects of potassium chloride and potassium bicarbonate on endothelial function, cardiovascular risk factors, and bone turnover in mild hypertensives.* *Hypertension.* 2010. 55(3): p. 681-8.
227. Mullan, B.A., et al., *Ascorbic Acid Reduces Blood Pressure and Arterial Stiffness in Type 2 Diabetes.* *Hypertension.* 2002. 40(6): p. 804-809.
228. Nightingale, A.K., et al., *Chronic oral ascorbic acid therapy worsens skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure.* *Eur J Heart Fail.* 2007. 9(3): p. 287-291.
229. Plantinga, Y., et al., *Supplementation With Vitamins C and E Improves Arterial Stiffness and Endothelial Function in Essential Hypertensive Patients.* *Am J Hypertens.* 2007. 20(4): p. 392-397.
230. Skyrme-Jones, R.A., et al., *Vitamin E supplementation improves endothelial function in type I diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study.* *J Am Coll Cardiol.* 2000. 36(1): p. 94-102.
231. Williams, C., et al., *Folic acid supplementation for 3 wk reduces pulse pressure and large artery stiffness independent of MTHFR genotype.* *Am J Clin Nutr.* 2005. 82(1): p. 26-31.
232. Zoungas, S., et al., *Cardiovascular Morbidity and Mortality in the Atherosclerosis and Folic Acid Supplementation Trial (ASFASIT) in Chronic Renal Failure.* *Journal of the American College of Cardiology.* 2006. 47(6): p. 1108-1116.
233. Khandaupour, N., et al., *Randomized clinical trial of folate supplementation in patients with peripheral arterial disease.* *British Journal of Surgery.* 2009. 96(9): p. 990-998.
234. van Dijk, R.A.J.M., et al., *Long-Term Homocysteine-Lowering Treatment With Folic Acid Plus Pyridoxine Is Associated With Decreased Blood Pressure but Not With Improved Brachial Artery Endothelium-Dependent Vasodilation or Carotid Artery Stiffness: A 2-Year, Randomized, Placebo-Controlled Trial.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001. 21(12): p. 2072-2079.
235. Kelly, R.P., et al., *Lack of effect of acute oral ingestion of vitamin C on oxidative stress, arterial stiffness or blood pressure in healthy subjects.* *Free Radic Res.* 2008. 42(5): p. 514-522.

236. Magliano, D., et al., *The Melbourne Atherosclerosis Vitamin E Trial (MAVET): a study of high dose vitamin E in smokers*. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 2006, 13(3): p. 341-347.
237. Rasool, A.H.G., et al., *Vitamin E and its effect on arterial stiffness in postmenopausal women – a randomized controlled trial*. *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2003, 41(12): p. 587-592.
238. Sharman, J.E., et al., *Alpha-lipoic acid does not acutely affect resistance and conduit artery function or oxidative stress in healthy men*. *Br J Clin Pharmacol*, 2004, 58(3): p. 243-248.
239. He, F.J., et al., *Effect of Modest Salt Reduction on Blood Pressure, Urinary Albumin, and Pulse Wave Velocity in White, Black, and Asian Mild Hypertensives*. *Hypertension*, 2009, 54(3): p. 482-488.
240. Todd, A.S., et al., *Dietary salt loading impairs arterial vascular reactivity*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2010, 91(3): p. 557-564.
241. Ray, S., et al., *Assessment of vascular and endothelial dysfunction in nutritional studies*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2014, 24(9): p. 940-6.
242. Teede, H.J., et al., *Dietary Soy Has Both Beneficial and Potentially Adverse Cardiovascular Effects: A Placebo-Controlled Study in Men and Postmenopausal Women 1*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001, 86(7): p. 3053-3060.
243. Törmälä, R., et al., *Equol production capability is associated with favorable vascular function in postmenopausal women using tibolone; no effect with soy supplementation*. *Atherosclerosis*, 2008, 198(1): p. 174-178.
244. Nestel, P.J., et al., *Soy Isoflavones Improve Systemic Arterial Compliance but Not Plasma Lipids in Menopausal and Perimenopausal Women*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(12): p. 3392-3398.
245. Teede, H.J., *Isoflavones Reduce Arterial Stiffness: A Placebo-Controlled Study in Men and Postmenopausal Women*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(6): p. 1066-1071.
246. Nestel, P., A. Fujii, and L. Zhang, *An isoflavone metabolite reduces arterial stiffness and blood pressure in overweight men and postmenopausal women*. *Atherosclerosis*, 2007, 192(1): p. 184-189.
247. Grassi, D., et al., *Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation in healthy males*. *Journal of hypertension*, 2009, 27(4): p. 774-781.
248. Karatzi, K., et al., *Red Wine Acutely Induces Favorable Effects on Wave Reflections and Central Pressures in Coronary Artery Disease Patients*. *Am J Hypertens*, 2005, 18(9): p. 1161-1167.
249. Karatzis, E., et al., *Acute effects of caffeine on blood pressure and wave reflections in healthy subjects: should we consider monitoring central blood pressure?* *Int J Cardiol*, 2005, 98(3): p. 425-430.
250. Waring, W., *Acute caffeine intake influences central more than peripheral blood pressure in young adults*. *Am J Hypertens*, 2003, 16(11): p. 919-924.
251. Vlachopoulos, C., K. Hirata, and M.F. O'Rourke, *Effect of caffeine on aortic elastic properties and wave reflection*. *Journal of hypertension*, 2003, 21(3): p. 563-570.
252. Turner, B., C. Molgaard, and P. Marchmann, *Effect of garlic (Allium sativum) powder tablets on serum lipids, blood pressure and arterial stiffness in normo-lipidaemic volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *BJN*, 2004, 92(04): p. 701.
253. Sluijs, L., et al., *Dietary supplementation with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid and aortic stiffness in overweight and obese adults*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 91(1): p. 175-183.

254. Laakso, M., et al., *Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance.* *J Clin Invest*, 1990, 85(6): p. 1844-52.
255. Westerbacka, J., A. Seppala-Lindroos, and H. Yki-Jarvinen, *Resistance to acute insulin induced decreases in large artery stiffness accompanies the insulin resistance syndrome.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(11): p. 5262-8.
256. Westerbacka, J., et al., *Insulin-induced decrease in large artery stiffness is impaired in uncomplicated type 1 diabetes mellitus.* *Hypertension*, 2000, 35(5): p. 1043-8.
257. Tamminen, M., et al., *Insulin-induced decreases in aortic wave reflection and central systolic pressure are impaired in type 2 diabetes.* *Diabetes Care*, 2002, 25(12): p. 2314-9.
258. Vehkavaara, S., et al., *Insulin therapy improves endothelial function in type 2 diabetes.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(2): p. 545-50.
259. Tamminen, M.K., et al., *Insulin therapy improves insulin actions on glucose metabolism and aortic wave reflection in type 2 diabetic patients.* *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(10): p. 855-860.
260. Koren, S., et al., *The effect of sitagliptin versus glibenclamide on arterial stiffness, blood pressure, lipids, and inflammation in type 2 diabetes mellitus patients.* *Diabetes Technol Ther*, 2012, 14(7): p. 561-7.
261. Segers, P., et al., *Amplification of the pressure pulse in the upper limb in healthy, middle-aged men and women.* *Hypertension*, 2009, 54(2): p. 414-20.
262. Gatzka, C.D., et al., *Gender differences in the timing of arterial wave reflection beyond differences in body height.* *J Hypertens*, 2001, 19(12): p. 2197-203.
263. Vergnaud, A.C., et al., *From 'optimal' to 'borderline' blood pressure in subjects under chronic antihypertensive therapy.* *J Hypertens*, 2008, 26(1): p. 138-44.
264. Protogerou, A.D., et al., *Increased pulse pressure amplification in treated hypertensive subjects with metabolic syndrome.* *Am J Hypertens*, 2007, 20(2): p. 127-33.
265. Boutouyrie, P., et al., *Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling.* *Circulation*, 1999, 100(13): p. 1387-93.
266. Roman, M.J., et al., *Impact of arterial stiffening on left ventricular structure.* *Hypertension*, 2000, 36(4): p. 489-94.
267. Kaess, B.M., et al., *Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension.* *JAMA*, 2012, 308(9): p. 875-81.
268. Cheng, H.M., et al., *Derivation and validation of diagnostic thresholds for central blood pressure measurements based on long-term cardiovascular risks.* *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(19): p. 1780-7.
269. Vlachopoulos, C., K. Aznaouridis, and C. Stefanadis, *Prediction of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality With Arterial Stiffness. A Systematic Review and Meta-Analysis.* *Journal of the American College of Cardiology*, 2010, 55(13): p. 1318-1327.
270. Mancia, G., et al., *2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).* *J Hypertens*, 2007, 25(6): p. 1105-87.
271. Anderson, S.G., T.A. Sanders, and J.K. Cruickshank, *Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality.* *Hypertension*, 2009, 53(5): p. 839-45.
272. Blacher, J., et al., *Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease.* *Circulation*, 1999, 99(18): p. 2434-9.
273. Boutouyrie, P., et al., *Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study.* *Hypertension*, 2002, 39(1): p. 10-5.



274. Choi, C.U., et al., *Impact of aortic stiffness on cardiovascular disease in patients with chest pain: assessment with direct intra-arterial measurement.* *Am J Hypertens*, 2007, 20(11): p. 1163-9.
275. Cruickshank, K., *Aortic Pulse-Wave Velocity and Its Relationship to Mortality in Diabetes and Glucose Intolerance: An Integrated Index of Vascular Function?* *Circulation*, 2002, 106(16): p. 2085-2090.
276. Laurent, S., et al., *Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients.* *Hypertension*, 2001, 37(5): p. 1236-41.
277. Mattace-Raso, F.U., et al., *Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study.* *Circulation*, 2006, 113(5): p. 657-63.
278. Meaume, S., et al., *Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in subjects >70 years of age.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12): p. 2046-50.
279. Mitchell, G.F., et al., *Arterial Stiffness and Cardiovascular Events: The Framingham Heart Study.* *Circulation*, 2010, 121(4): p. 505-511.
280. Pannier, B., et al., *Stiffness of capacitive and conduit arteries: prognostic significance for end-stage renal disease patients.* *Hypertension*, 2005, 45(4): p. 592-6.
281. Shoji, T., et al., *Diabetes mellitus, aortic stiffness, and cardiovascular mortality in end-stage renal disease.* *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(10): p. 2117-24.
282. Shokawa, T., et al., *Pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality: findings from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima study.* *Circ J*, 2005, 69(3): p. 259-64.
283. Sutton-Tyrrell, K., *Elevated Aortic Pulse Wave Velocity, a Marker of Arterial Stiffness, Predicts Cardiovascular Events in Well-Functioning Older Adults.* *Circulation*, 2005, 111(25): p. 3384-3390.
284. Terai, M., et al., *Comparison of arterial functional evaluations as a predictor of cardiovascular events in hypertensive patients: the Non-Invasive Atherosclerotic Evaluation in Hypertension (NOAH) study.* *Hypertens Res*, 2008, 31(6): p. 1135-45.
285. Wang, K.L., et al., *Wave Reflection and Arterial Stiffness in the Prediction of 15-Year All-Cause and Cardiovascular Mortalities: A Community-Based Study.* *Hypertension*, 2010, 55(3): p. 799-805.
286. Willum Hansen, T., *Prognostic Value of Aortic Pulse Wave Velocity as Index of Arterial Stiffness in the General Population.* *Circulation*, 2006, 113(5): p. 664-670.
287. Janner, J.H., et al., *The association between aortic augmentation index and cardiovascular risk factors in a large unselected population.* *J Hum Hypertens.*, 2012, 26(8): p. 476-84. doi: 10.1038/jhh.2011.59. Epub 2011 Jun 9.
288. Vlachopoulos, C., et al., *Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with central haemodynamics: a systematic review and meta-analysis.* *Eur Heart J*, 2010, 31(15): p. 1865-1871.
289. Weber, T., et al., *Pulse waveform characteristics predict cardiovascular events and mortality in patients undergoing coronary angiography.* *Journal of hypertension*, 2010, 28(4): p. 797-805.
290. London, G.M., et al., *Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure.* *Hypertension*, 2001, 38(3): p. 434-8.
291. Dart, A.M., et al., *Brachial blood pressure but not carotid arterial waveforms predict cardiovascular events in elderly female hypertensives.* *Hypertension*, 2006, 47(4): p. 785-90.
292. McEniery, C.M., et al., *The Impact of Cardiovascular Risk Factors on Aortic Stiffness and Wave Reflections Depends on Age: The Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT III).* *Hypertension*, 2010, 56(4): p. 591-597.

293. Williams, B., et al., *Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: Principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study.* *Circulation*, 2006, 113(9): p. 1213-1225.
294. Asmar, R.G., et al., *Improvement in Blood Pressure, Arterial Stiffness and Wave Reflections With a Very-Low-Dose Perindopril/Indapamide Combination in Hypertensive Patient: A Comparison With Atenolol.* *Hypertension*, 2001, 38(4): p. 922-926.
295. Laurent, S., et al., *Expert consensus document on arterial stiffness: Methodological issues and clinical applications.* *Eur Heart J*, 2006, 27(21): p. 2588-2605.
296. Blacher, J., et al., *Pulse pressure not mean pressure determines cardiovascular risk in older hypertensive patients.* *Arch Intern Med*, 2000, 160(8): p. 1085-9.
297. Darne, B., et al., *Pulsatile versus steady component of blood pressure: a cross-sectional analysis and a prospective analysis on cardiovascular mortality.* *Hypertension*, 1989, 13(4): p. 392-400.
298. Blacher, J., et al., *AORTIC PULSE WAVE VELOCITY INDEX AND MORTALITY IN END-STAGE RENAL DISEASE.* *Journal of hypertension*, 2000, 18: p. S196.
299. Wing, L.M., et al., *A comparison of outcomes with angiotensin-converting-enzyme inhibitors and diuretics for hypertension in the elderly.* *N Engl J Med*, 2003, 348(7): p. 583-92.
300. Dahlöf, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol.* *Lancet*, 2002, 359(9311): p. 995-1003.
301. Dahlöf, B., et al., *Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial.* *Lancet*, 2005, 366(9489): p. 895-906.
302. Jamerson, K., et al., *Bena;epiril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients.* *N Engl J Med*, 2008, 359(23): p. 2417-28.
303. Williams, B., et al., *Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study.* *Circulation*, 2006, 113(9): p. 1213-25.
304. Trudeau, L., *Central blood pressure as an index of antihypertensive control: determinants and potential value.* *Can J Cardiol*, 2014, 30(5 Suppl): p. S23-8.
305. Sharman, J.E., et al., *Randomized trial of guiding hypertension management using central aortic blood pressure compared with best-practice care: principal findings of the BP GUIDE study.* *Hypertension*, 2013, 62(6): p. 1138-45.
306. Linsell, C.R., et al., *Circadian rhythms of epinephrine and norepinephrine in man.* *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 60(6): p. 1210-5.
307. Shepherd, J.T. and G. Mancia, *Reflex control of the human cardiovascular system.* *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1986, 105: p. 1-99.
308. Hainsworth, R., *Reflexes from the heart.* *Physiol Rev*, 1991, 71(3): p. 617-58.
309. Kawashima, T., *Anatomy of the cardiac nervous system with clinical and comparative morphological implications.* *Anat Sci Int*, 2011, 86(1): p. 30-49.
310. McCorry, L.K., *TEACHERS' TOPICS Physiology of the Autonomic Nervous System.* 2007, 71(4).
311. Hayano, J. and F. Yasuma, *Hypothesis: respiratory sinus arrhythmia is an intrinsic resting function of cardiopulmonary system.* *Cardiovasc Res*, 2003, 58(1): p. 1-9.
312. Camilleri, M., *Gastrointestinal motor mechanisms and motility: Hormonal and neural regulation.* 1995: p. 237-253.
313. Bernardi, L., et al., *Respiratory sinus arrhythmia in the denervated human heart.* *J Appl Physiol* (1985), 1989, 67(4): p. 1447-55.
314. Eckberg, D.L., *The human respiratory gate.* *J Physiol*, 2003, 548(Pt 2): p. 339-52.

315. Taylor, J.A. and D.L. Eckberg, *Fundamental relations between short-term RR interval and arterial pressure oscillations in humans*. *Circulation*, 1996, 93(8): p. 1527-32.
316. Myers, B.D., et al., *Role of cardiac atria in the human renal response to changing plasma volume*. *Am J Physiol*, 1988, 254(4 Pt 2): p. F562-73.
317. Baily, R.G., et al., *Direct neurohumoral evidence for isolated sympathetic nervous system activation to skeletal muscle in response to cardiopulmonary baroreceptor unloading*. *Circ Res*, 1990, 66(6): p. 1720-8.
318. Ketch, T., et al., *Four faces of baroreflex failure: hypertensive crisis, volatile hypertension, orthostatic tachycardia, and malignant vagotonia*. *Circulation*, 2002, 105(21): p. 2518-23.
319. Ewing, D.J., et al., *The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes*. *Diabetes Care*, 1985, 8(5): p. 491-8.
320. P. V., *Neuropathie autonome cardiaque et diabète*. In: *Coeur et diabète. Prise en charge et suivi des patients diabétiques*. Paris: Frison-Roche, 1999: p. 369-423.
321. van Ravenswaaij-Arts, C.M., et al., *Heart rate variability*. *Ann Intern Med*, 1993, 118(6): p. 436-47.
322. Vinik, A.I. and D. Ziegler, *Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy*. *Circulation*, 2007, 115(3): p. 387-397.
323. Vinik, A.I. and D. Ziegler, *Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy*. *Circulation*, 2007, 115(3): p. 387-97.
324. Malliani, A., et al., *Sympathovagal balance: a reappraisal*. *Circulation*, 1998, 98(23): p. 2640-3.
325. Pomeranz, B., et al., *Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis*. *Am J Physiol*, 1985, 248(1 Pt 2): p. H151-3.
326. *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology*. *Circulation*, 1996, 93(5): p. 1043-65.
327. Bernardi, L., et al., *Methods of investigation for cardiac autonomic dysfunction in human research studies*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27(7): p. 654-64.
328. Bernardi, L., et al., *Impaired circadian modulation of sympathovagal activity in diabetes. A possible explanation for altered temporal onset of cardiovascular disease*. *Circulation*, 1992, 86(5): p. 1443-1452.
329. Spallone, V., et al., *Relationship between the circadian rhythms of blood pressure and sympathovagal balance in diabetic autonomic neuropathy*. *Diabetes*, 1993, 42(12): p. 1745-1752.
330. Stauss, H.M., *Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34(4): p. 362-8.
331. Bertram, D., et al., *The arterial baroreceptor reflex of the rat exhibits positive feedback properties at the frequency of mayer waves*. *J Physiol*, 1998, 513 ( Pt 1): p. 251-61.
332. Smyth, H.S., P. Sleight, and G.W. Pickering, *Reflex regulation of arterial pressure during sleep in man. A quantitative method of assessing baroreflex sensitivity*. *Circ Res*, 1969, 24(1): p. 109-21.
333. Bertinieri, G., et al., *A new approach to analysis of the arterial baroreflex*. *J Hypertens Suppl*, 1985, 3(3): p. S79-81.
334. Pagani, M., et al., *Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension*. *Hypertension*, 1988, 12(6): p. 600-610.
335. Rosengård-Bärlund, M., et al., *Early autonomic dysfunction in type 1 diabetes: a reversible disorder?* *Diabetologia*, 2009, 52(6): p. 1164-1172.
336. Bernardi, L., et al., *New method to measure and improve consistency of baroreflex sensitivity values*. *Clin Auton Res*, 2010, 20(6): p. 353-361.

337. Grassi, G., et al., *Baroreflex Control of Sympathetic Nerve Activity in Essential and Secondary Hypertension*. *Hypertension*, 1998, 31(1): p. 68-72.
338. Wallin, B.G., et al., *Renal noradrenaline spillover correlates with muscle sympathetic activity in humans*. *J Physiol*, 1996, 491 ( Pt 3): p. 881-7.
339. Esler, M., et al., *Determination of norepinephrine apparent release rate and clearance in humans*. *Life Sciences*, 1979, 25(17): p. 1461-1470.
340. Hilsted, J., N.J. Christensen, and S. Madsbad, *Whole Body Clearance of Norepinephrine. THE SIGNIFICANCE OF ARTERIAL SAMPLING AND OF SURGICAL STRESS*. *Journal of Clinical Investigation*, 1983, 71(3): p. 500-505.
341. Maignan, E., et al., *Adrenaline hypothesis: effect of formoterol on noradrenaline release*. *J Auton Pharmacol*, 2001, 21(5-6): p. 237-42.
342. Raffel, D.M., et al., *Mechanism-based strategies for mapping heart sympathetic nerve function*. *Nucl Med Biol*, 1995, 22(8): p. 1919-26.
343. Kreiner, G., et al., *Myocardial m-[123I]iodobenzylguanidine scintigraphy for the assessment of adrenergic cardiac innervation in patients with IDDM. Comparison with cardiovascular reflex tests and relationship to left ventricular function*. *Diabetes*, 1995, 44(5): p. 543-9.
344. Schwaiger, M., et al., *Evidence for regional catecholamine uptake and storage sites in the transplanted human heart by positron emission tomography*. *J Clin Invest*, 1991, 87(5): p. 1681-90.
345. Stevens, M.J., et al., *Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes: implications for enhanced cardiovascular risk*. *Circulation*, 1998, 98(10): p. 961-8.
346. Allman, K.C., et al., *Noninvasive assessment of cardiac diabetic neuropathy by carbon-11 hydroxyephedrine and positron emission tomography*. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 22(5): p. 1425-32.
347. Turpeinen, A.K., et al., *Long-term effect of acetyl-L-carnitine on myocardial 123I-MIBG uptake in patients with diabetes*. *Clin Auton Res*, 2000, 10(1): p. 13-6.
348. Stevens, M.J., et al., *Regression and progression of cardiac sympathetic dysinnervation complicating diabetes: an assessment by C-11 hydroxyephedrine and positron emission tomography*. *Metabolism*, 1999, 48(1): p. 92-101.
349. Pagani, M., et al., *Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy*. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 1988, 23(2): p. 143-153.
350. Laitinen, T., et al., *Power spectral analysis of heart rate variability during hyperinsulinemia in nondiabetic offspring of type 2 diabetic patients: evidence for possible early autonomic dysfunction in insulin-resistant subjects*. *Diabetes*, 1999, 48(6): p. 1295-9.
351. Pal, G.K., et al., *Effects of gender on sympathovagal imbalance, prehypertension status, and cardiovascular risks in first-degree relatives of type 2 diabetics*. *Am J Hypertens*, 2014, 27(3): p. 317-24.
352. Ziegler, D., et al., *Time- and frequency-domain estimation of early diabetic cardiovascular autonomic neuropathy*. *Clinical Autonomic Research*, 2001, 11(6): p. 369-376.
353. Tank, J., et al., *Spontaneous baroreflex sensitivity and heart rate variability are not superior to classic autonomic testing in older patients with type 2 diabetes*. *Am J Med Sci*, 2001, 322(1): p. 24-30.
354. Fagius, J. and C. Berne, *The increase in sympathetic nerve activity after glucose ingestion is reduced in type I diabetes*. *Clin Sci (Lond)*, 2000, 98(5): p. 627-632.
355. Hoffman, R.P., et al., *Muscle Sympathetic Nerve Activity Is Reduced in IDDM Before Overt Autonomic Neuropathy*. *Diabetes*, 1993, 42(3): p. 375-380.
356. Huggett, R.J., et al., *Disparity of autonomic control in type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2004, 48(1): p. 172-179.
357. Hoelddke, R.D. and K.M. Cilmi, *Norepinephrine secretion and production in diabetic autonomic neuropathy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59(2): p. 246-52.

358. Hilsted, J., et al., *Hemodynamics in diabetic orthostatic hypotension*. *Journal of Clinical Investigation*, 1981. 68(6): p. 1427-1434.
359. Hilsted, J., H. Galbo, and N.J. Christensen, *Impaired Responses of Catecholamines, Growth Hormone, and Cortisol to Graded Exercise in Diabetic Autonomic Neuropathy*. *Diabetes*, 1980. 29(4): p. 257-262.
360. Hepburn, D.A., K.M. MacLeod, and B.M. Frier, *Physiological, Symptomatic and Hormonal Responses to Acute Hypoglycaemia in Type 1 Diabetic Patients with Autonomic Neuropathy*. *Diabetic Medicine*, 1993. 10(10): p. 940-949.
361. Fanelli, C., et al., *Long-term intensive therapy of IDDM patients with clinically overt autonomic neuropathy: effects on hypoglycemia awareness and counterregulation*. *Diabetes*, 1997. 46(7): p. 1172-1181.
362. Dessen, P.H., et al., *Autonomic dysfunction in systemic sclerosis: Sympathetic overactivity and instability*. *The American Journal of Medicine*, 1992. 93(2): p. 143-150.
363. Vaz, M., et al., *Variability of cardiovascular and plasma noradrenaline responses to sustained isometric contraction in normal human subjects*. *Clin Sci (Lond)*, 1993. 85(1): p. 45-9.
364. Luft, D., et al., *Correlates of venous catecholamine concentrations in patients with type 1 diabetes during a cold pressor test*. *Clinical Autonomic Research*, 2000. 10(3): p. 131-137.
365. Murata, K., et al., *A Novel Method for the Assessment of Autonomic Neuropathy in Type 2 Diabetic Patients: a Comparative Evaluation of <sup>123</sup>I-MIBG Myocardial Scintigraphy and Power Spectral Analysis of Heart Rate Variability*. *Diabet. Med.*, 1996. 13(3): p. 266-272.
366. Schnell, O., et al., *Reduced myocardial <sup>123</sup>I-metaiodobenzylguanidine uptake in newly diagnosed IDDM patients*. *Diabetes*, 1996. 45(6): p. 801-5.
367. Wulsin, L.R., et al., *Autonomic Imbalance as a Predictor of Metabolic Risks, Cardiovascular Disease, Diabetes, and Mortality: Autonomic Imbalance Predicts CVD, DM, Mortality*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015: p. jc20144123.
368. Straznicki, N.E., et al., *Blunted sympathetic neural response to oral glucose in obese subjects with the insulin-resistant metabolic syndrome*. *Am J Clin Nutr*, 2009. 89(1): p. 27-36.
369. Freeman, R., L. Landsberg, and J. Young, *The treatment of neurogenic orthostatic hypotension with 3,4-DL-threo-dihydroxyphenylserine: a randomized, placebo-controlled, crossover trial*. *Neurology*, 1999. 53(9): p. 2151-7.
370. Barretto, A.C., et al., *Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients*. *Int J Cardiol*, 2009. 135(3): p. 302-7.
371. Matsuo, S., et al., *[Characteristics of regional sympathetic innervation in diabetic patients with silent myocardial ischemia assessed by <sup>123</sup>I-metaiodobenzylguanidine imaging]*. *Kaku Igaku*, 1996. 33(5): p. 493-9.
372. Koistinen, M.J., et al., *No Difference in Cardiac Innervation of Diabetic Patients With Painful and Asymptomatic Coronary Artery Disease*. *Diabetes Care*, 1996. 19(3): p. 231-235.
373. Yokoyama, I., et al., *Hyperglycemia rather than insulin resistance is related to reduced coronary flow reserve in NIDDM*. *Diabetes*, 1998. 47(1): p. 119-24.
374. Kempler, P., S. Tesfaye, and N. Chaturvedi, *The EURODIAB IDDM Complications Study Group. Autonomic neuropathy is associated with increased cardiovascular risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study*. *Diabet Med*, 2002. 19: p. 900-09.
375. Gerritsen, J., et al., *Impaired Autonomic Function Is Associated With Increased Mortality, Especially in Subjects With Diabetes, Hypertension, or a History of Cardiovascular Disease: The Hoorn Study*. *Diabetes Care*, 2001. 24(10): p. 1793-1798.

376. Valensi, P., et al., *Predictive value of cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients with or without silent myocardial ischemia*. *Diabetes Care*, 2001, 24(2): p. 339-43.
377. Katz, A., et al., *A simple bedside test of 1-minute heart rate variability during deep breathing as a prognostic index after myocardial infarction*. *Am Heart J*, 1999, 138(1 Pt 1): p. 32-8.
378. Levitt, N.S., et al., *The natural progression of autonomic neuropathy and autonomic function tests in a cohort of people with IDDM*. *Diabetes Care*, 1996, 19(7): p. 751-4.
379. Burgos, L.G., et al., *Increased intraoperative cardiovascular morbidity in diabetics with autonomic neuropathy*. *Anesthesiology*, 1989, 70(4): p. 591-7.
380. Klabunde, R.E., *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2012; p. 124-134.
381. Hunt, S., *Reinnervation of the transplanted heart--why is it important?* *N Engl J Med*, 2001, 345(10): p. 762-4.
382. Imai, K., et al., *Vagally mediated heart rate recovery after exercise is accelerated in athletes but blunted in patients with chronic heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 1994, 24(6): p. 1529-35.
383. Jose, A.D. and D. Collison, *The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man*. *Cardiovasc Res*, 1970, 4(2): p. 160-7.
384. Opthof, T., *The normal range and determinants of the intrinsic heart rate in man*. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(1): p. 177-84.
385. Sodolski, T. and A. Kutarski, *Impedance cardiography: A valuable method of evaluating haemodynamic parameters*. *Cardiol J*, 2007, 14(2): p. 115-26.
386. Rossi, P., et al., *Stomach distension increases efferent muscle sympathetic nerve activity and blood pressure in healthy humans*. *J Neurol Sci*, 1998, 161(2): p. 148-55.
387. Mathias, C.J., et al., *Cardiovascular, biochemical and hormonal changes during food-induced hypotension in chronic autonomic failure*. *J Neurol Sci*, 1989, 94(1-3): p. 255-69.
388. MacIntosh, C., J.E. Morley, and I.M. Chapman, *The anorexia of aging*. *Nutrition*, 2000, 16(10): p. 983-95.
389. Rayner, C.K., et al., *Effects of age on proximal gastric motor and sensory function*. *Scand J Gastroenterol*, 2000, 35(10): p. 1041-7.
390. van Orshoven, N.P., et al., *Effect of gastric distension on cardiovascular parameters: gastrovascular reflex is attenuated in the elderly*. *J Physiol*, 2004, 555(Pt 2): p. 573-83.
391. Gentilcore, D., et al., *Gastric distension attenuates the hypotensive effect of intraduodenal glucose in healthy older subjects*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295(2): p. R472-7.
392. Sidery, M.B., A.J. Cowley, and I.A. MacDonald, *Cardiovascular responses to a high-fat and a high-carbohydrate meal in healthy elderly subjects*. *Clin Sci (Lond)*, 1993, 84(3): p. 263-70.
393. Kelbaek, H., et al., *Central haemodynamic changes after a meal*. *Br Heart J*, 1989, 61(6): p. 506-9.
394. Van Orshoven, N.P., et al., *Postprandial Hypotension in Clinical Geriatric Patients and Healthy Elderly: Prevalence Related to Patient Selection and Diagnostic Criteria*. *J Aging Res*, 2010, 2010: p. 1-7.
395. Fukushima, T., et al., *Role of intestinal peptides and the autonomic nervous system in postprandial hypotension in patients with multiple system atrophy*. *J Neurol*, 2013, 260(2): p. 475-83.
396. Jonk, A.M., et al., *Meal-related increases in microvascular vasomotion are impaired in obese individuals: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance*. *Diabetes Care*, 2011, 34 Suppl 2: p. S342-8.

397. Taylor, J.L., et al., *Acute effects of a mixed meal on arterial stiffness and central hemodynamics in healthy adults*. *Am J Hypertens*, 2014. 27(3): p. 331-7.
398. Murray, T., et al., *Postprandial effects on arterial stiffness parameters in healthy young adults*. *Vasc Med*, 2015. 20(6): p. 501-8.
399. Westerbacka, J., et al., *Diminished Wave Reflection in the Aorta : A Novel Physiological Action of Insulin on Large Blood Vessels*. *Hypertension*, 1999. 33(5): p. 1118-1122.
400. Greenfield, J.R., et al., *Effect of postprandial insulinemia and insulin resistance on measurement of arterial stiffness (augmentation index)*. *Int J Cardiol*, 2007. 114(1): p. 50-6.
401. Williams, S.B., et al., *Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo*. *Circulation*, 1998. 97(17): p. 1695-701.
402. Marfella, R., et al., *Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia*. *Circulation*, 2000. 101(19): p. 2247-51.
403. Srinivasan, S., *Glucose Regulates Monocyte Adhesion Through Endothelial Production of Interleukin-8*. *Circ Res*, 2003. 92(4): p. 371-377.
404. Kugiyama, K., et al., *Transferable lipids in oxidized low-density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells*. *Circ Res*, 1993. 73(2): p. 335-43.
405. Nitenberg, A., E. Cosson, and I. Pham, *Postprandial endothelial dysfunction: role of glucose, lipids and insulin*. *Diabetes Metab*, 2006. 32 Spec No2: p. 2S28-33.
406. Wautier, J.L., E. Boulanger, and M.P. Wautier, *Postprandial hyperglycemia alters inflammatory and hemostatic parameters*. *Diabetes Metab*, 2006. 32 Spec No2: p. 2S34-6.
407. Lundman, P., et al., *Transient triglyceridemia decreases vascular reactivity in young, healthy men without risk factors for coronary heart disease*. *Circulation*, 1997. 96(10): p. 3266-8.
408. Plotnick, G.D., *Effect of Antioxidant Vitamins on the Transient Impairment of Endothelium—Dependent Brachial Artery Vasoactivity Following a Single High-Fat Meal*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1997. 278(20): p. 1682.
409. Fagius, J. and C. Berne, *Increase in muscle nerve sympathetic activity in humans after food intake*. *Clin Sci (Lond)*, 1994. 86(2): p. 159-67.
410. Rossi, P., et al., *Stomach distension increases efferent muscle sympathetic nerve activity and blood pressure in healthy humans*. *J Neurol Sci*, 1998. 161(2): p. 148-155.
411. Lu, C.L., et al., *Postprandial changes of sympathovagal balance measured by heart rate variability*. *Dig Dis Sci*, 1999. 44(4): p. 857-861.
412. Routledge, H.C., et al., *Cardiac vagal response to water ingestion in normal human subjects*. *Clin Sci (Lond)*, 2002. 103(2): p. 157-62.
413. Jordan, J., et al., *The pressor response to water drinking in humans : a sympathetic reflex?* *Circulation*, 2000. 101(5): p. 504-9.
414. Fagius, J., et al., *Increase in muscle nerve sympathetic activity after glucose intake is blunted in the elderly*. *Clinical Autonomic Research*, 1996. 6(4): p. 195-203.
415. Monahan, K.D., D.J. Dyckman, and C.A. Ray, *Effect of acute hyperlipidemia on autonomic and cardiovascular control in humans*. *J Appl Physiol (1985)*, 2007. 103(1): p. 162-9.
416. Florian, J.P. and J.A. Pawelczyk, *Non-esterified fatty acids increase arterial pressure via central sympathetic activation in humans*. *Clin Sci (Lond)*, 2010. 118(1): p. 61-9.
417. Hoeldtke, R.D., *Epinephrine Secretion, Hypoglycemia Unawareness, and Diabetic Autonomic Neuropathy*. *Ann Intern Med*, 1994. 120(6): p. 512.
418. Cryer, P.E., *Banting Lecture. Hypoglycemia: the limiting factor in the management of IDDM*. *Diabetes*, 1994. 43(11): p. 1378-1389.

419. De Feo, P., et al., *The adrenergic contribution to glucose counterregulation in type 1 diabetes mellitus. Dependency on A-cell function and mediation through beta 2-adrenergic receptors.* Diabetes., 1983. 32(10): p. 887-93.
420. Brunnicardi, F.C., D.M. Shavelle, and D.K. Andersen, *Neural regulation of the endocrine pancreas.* Int J Pancreatol, 1995. 18(3): p. 177-95.
421. Porte, D., Jr. and R.H. Williams, *Inhibition of insulin release by norepinephrine in man.* Science, 1966. 152(3726): p. 1248-50.
422. Kurose, T., et al., *Mechanism of sympathetic neural regulation of insulin, somatostatin, and glucagon secretion.* Am J Physiol, 1990. 258(1 Pt 1): p. E220-7.
423. Ahren, B. and I. Lundquist, *Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo.* Eur J Pharmacol, 1981. 71(1): p. 93-104.
424. Kawai, K., et al., *Evidence that glucagon stimulates insulin secretion through its own receptor in rats.* Diabetologia., 1995. 38(3): p. 274-6.
425. Rocchini, A.P., et al., *The Effect of Weight Loss on the Sensitivity of Blood Pressure to Sodium in Obese Adolescents.* New England Journal of Medicine, 1989. 321(9): p. 580-585.
426. Landsberg, L., *Role of the Sympathetic Adrenal System in the Pathogenesis of the Insulin Resistance Syndrome.* Ann N Y Acad Sci, 1999. 892(1 THE METABOLIC): p. 84-90.
427. Hausberg, M., et al., *Dissociation of sympathoexcitatory and vasodilator actions of modestly elevated plasma insulin levels.* Journal of hypertension, 1995. 13(9): p. 1015-1021.
428. Esler, M., *The sympathetic system and hypertension* ~1. Am J Hypertens, 2000. 13(6): p. S99-S105.
429. Berkelaar, M., et al., *Effects of induced hyperinsulinaemia with and without hyperglycaemia on measures of cardiac vagal control.* Diabetologia, 2013(23404443).
430. Griffioen, K.J., et al., *GLP-1 receptor stimulation depresses heart rate variability and inhibits neurotransmission to cardiac vagal neurons.* Cardiovasc Res, 2011. 89(1): p. 72-8.
431. Yamamoto, H., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons.* J Clin Invest, 2002. 110(1): p. 43-52.
432. Bharucha, A.E., et al., *Effects of glucagon-like peptide-1, yohimbine, and nitroergic modulation on sympathetic and parasympathetic activity in humans.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. 295(3): p. R874-80.
433. Russell-Jones, D., et al., *Liraglutide vs insulin glargine and placebo in combination with metformin and sulfonylurea therapy in type 2 diabetes mellitus (LEAD-5 met+SU): a randomised controlled trial.* Diabetologia, 2009. 52(19688338): p. 2046-2055.
434. Nauck, M., et al., *Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study.* Diabetes Care, 2009. 32(18931095): p. 84-90.
435. Wei, Y. and S. Mojsov, *Distribution of GLP-1 and PACAP receptors in human tissues.* Acta Physiol Scand, 1996. 157(8830893): p. 355-357.
436. Wahren, J., *C-peptide: new findings and therapeutic implications in diabetes.* Clin Physiol Funct Imaging, 2004. 24(4): p. 180-9.
437. Gentilecore, D., et al., *Comparative effects of oral and intraduodenal glucose on blood pressure, heart rate, and splanchnic blood flow in healthy older subjects.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. 297(3): p. R716-22.
438. O'Donovan, D., et al., *Postprandial hypotension in response to duodenal glucose delivery in healthy older subjects.* J Physiol, 2002. 540(Pt 2): p. 673-9.



439. Vanis, L., et al., *Comparative effects of glucose and xylose on blood pressure, gastric emptying and incretin hormones in healthy older subjects.* *Br J Nutr*, 2011, 105(11): p. 1644-51.
440. Hlebowicz, J., et al., *The effect of endogenously released glucose, insulin, glucagon-like peptide 1, ghrelin on cardiac output, heart rate, stroke volume, and blood pressure.* *Cardiovasc Ultrasound*, 2011, 9: p. 43.
441. Visvanathan, R., et al., *The effects of drinks made from simple sugars on blood pressure in healthy older people.* *BJN*, 2005, 93(05): p. 575.
442. Gentilecore, D., et al., *The alpha (alpha)-glucosidase inhibitor, acarbose, attenuates the blood pressure and splanchnic blood flow responses to intraduodenal sucrose in older adults.* *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2011, 66(8): p. 917-24.
443. Visvanathan, R., M. Horowitz, and I. Chapman, *The hypotensive response to oral fat is comparable but slower compared with carbohydrate in healthy elderly subjects.* *Br J Nutr.*, 2006, 95(2): p. 340-5.
444. Gentilecore, D., et al., *Effects of intraduodenal glucose, fat, and protein on blood pressure, heart rate, and splanchnic blood flow in healthy older subjects.* *Am J Clin Nutr*, 2008, 87(1): p. 156-61.
445. Gosmanov, A.R., et al., *Effects of oral and intravenous fat load on blood pressure, endothelial function, sympathetic activity, and oxidative stress in obese healthy subjects.* *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): p. E953-8.
446. Florian, J.P. and J.A. Pawelczyk, *Sympathetic and haemodynamic responses to lipids in healthy human ageing.* *Exp Physiol*, 2010, 95(4): p. 486-97.
447. Trahair, L.G., et al., *Effects of exogenous glucagon-like peptide-1 on the blood pressure, heart rate, mesenteric blood flow, and glycaemic responses to intraduodenal glucose in healthy older subjects.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(12): p. E2628-34.
448. Wu, T., et al., *Effects of sitagliptin on blood pressure and heart rate in response to intraduodenal glucose infusion in patients with Type 2 diabetes: a potential role for glucose-dependent insulinotropic polypeptide?* *Diabet Med*, 2015, 32(5): p. 595-600.
449. Kawano, H., et al., *Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery.* *J Am Coll Cardiol*, 1999, 34(1): p. 146-54.
450. Albertini, J.P., et al., *Elevated concentrations of soluble E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM. Effect of intensive insulin treatment.* *Diabetes Care*, 1998, 21(6): p. 1008-13.
451. Forst, T., et al., *Impact of insulin on microvascular blood flow and endothelial cell function in the postprandial state in patients with Type 1 diabetes.* *J Diabetes Complications*, 2005, 19(3): p. 128-32.
452. Tooke, J.E., et al., *The effects of intravenous insulin infusion on skin microcirculatory flow in Type 1 diabetes.* *Int J Microcirc Clin Exp*, 1985, 4(1): p. 69-83.
453. Katz, A., et al., *Diminished skin blood flow in Type 1 diabetes: evidence for non-endothelium-dependent dysfunction.* *Clin Sci (Lond)*, 2001, 101(1): p. 59-64.
454. Forst, T., et al., *Postprandial vascular effects of VLAject compared with insulin lispro and regular human insulin in patients with type 2 diabetes.* *Diabetes Care*, 2010, 33(1): p. 116-20.
455. Scognamiglio, R., et al., *Effects of different insulin regimes on postprandial myocardial perfusion defects in type 2 diabetic patients.* *Diabetes Care*, 2006, 29(1): p. 95-100.
456. Negrean, M., 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.* *The American journal of clinical nutrition*, 2007, 85(5): p. 1236-43.

457. Cowley, A.J., et al., *Post-prandial worsening of angina: all due to changes in cardiac output?* *Heart*, 1991. 66(2): p. 147-150.
458. Levin, L.A. and V.V. Mootha, *Postprandial Transient Visual Loss*. *Ophthalmology*, 1997. 104(3): p. 397-401.
459. Waaler, B.A., et al., *Mechanisms behind the postprandial increase in cardiac output: a clue obtained from transplanted hearts*. *European Journal of Applied Physiology*, 2006. 97(5): p. 516-520.
460. Routledge, H.C., et al., *Cardiac vagal response to water ingestion in normal human subjects*. *Clin. Sci.*, 2002. 103(2): p. 157-162.
461. Lu, C.L., et al., *Gastric myoelectrical activity in patients with cervical spinal cord injury*. *Am J Gastroenterol*, 1998. 93(12): p. 2391-6.
462. Baliga, R.R., et al., *Cardiovascular and hormonal responses to food ingestion in humans with spinal cord transection*. *Clin Auton Res*, 1997. 7(3): p. 137-41.
463. Catz, A., et al., *Hemodynamic effects of liquid food ingestion in mid-thoracic paraplegia: is supine postprandial hypotension related to thoracic spinal cord damage?* *Spinal Cord*, 2007. 45(1): p. 96-103.
464. Balkau, B., et al., *Is there a glycemic threshold for mortality risk?* *Diabetes Care*, 1999. 22(5): p. 696-699.
465. de Veegt, F., et al., *Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study*. *Diabetologia*, 1999. 42(8): p. 926-931.
466. Donahue, R.P., et al., *Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry*. *Honolulu Heart Program*. *Diabetes*, 1987. 36(6): p. 689-92.
467. Lowe, L.P., et al., *Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men*. *The Chicago Heart Association Detection Project in Industry Study*. *Diabetes Care*, 1997. 20(2): p. 163-9.
468. The DECODE study group, *Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts*. *Diabetes Care*, 2003. 26(1): p. 61-9.
469. Cavalot, F., et al., *Postprandial Blood Glucose Is a Stronger Predictor of Cardiovascular Events Than Fasting Blood Glucose in Type 2 Diabetes Mellitus, Particularly in Women: Lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. 91(3): p. 813-819.
470. Hanefeld, M., et al., *Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up*. *Diabetologia*, 1996. 39(12): p. 1577-83.
471. Chiasson, J.L., et al., *Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial*. *Jama*, 2003. 290(4): p. 486-94.
472. Pettitt, D.J., et al., *Development of retinopathy and proteinuria in relation to plasma-glucose concentrations in Pima Indians*. *Lancet*, 1980. 2(8203): p. 1050-2.
473. Ladyzynski, P., et al., *Validation of a hemoglobin A1c model in patients with type 1 and type 2 diabetes and its use to go beyond the averaged relationship of hemoglobin A1c and mean glucose level*. *J Transl Med*, 2014. 12: p. 328.
474. Association, A.D., *Standards of medical care in diabetes—2015*. 6. *Glycemic targets*. *Diabetes Care*, 2015. 38 (Suppl 1): p. S33-S40.
475. Miller, K.M., et al., *Evidence of a strong association between frequency of self-monitoring of blood glucose and hemoglobin A1c levels in T1D exchange clinic registry participants*. *Diabetes Care*, 2013. 36(7): p. 2009-14.
476. Davidson, M.B., et al., *The effect of self monitoring of blood glucose concentrations on glycated hemoglobin levels in diabetic patients not taking insulin: a blinded, randomized trial*. *Am J Med*, 2005. 118(4): p. 422-5.

477. Blevins, T.C., et al., *Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists Consensus Panel on continuous glucose monitoring*. *Endocr Pract*, 2010, 16(5): p. 730-45.
478. Battelino, T., et al., *Effect of continuous glucose monitoring on hypoglycemia in type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 2011, 34(4): p. 795-800.
479. Choudhary, P., et al., *Real-time continuous glucose monitoring significantly reduces severe hypoglycemia in hypoglycemia-unaware patients with type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 2013, 36(12): p. 4160-2.
480. Blackberry, I.D., et al., *An exploratory trial of basal and prandial insulin initiation and titration for type 2 diabetes in primary care with adjunct retrospective continuous glucose monitoring: INITIATION study*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 106(2): p. 247-55.
481. Klonoff, D.C., et al., *Continuous glucose monitoring: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(10): p. 2968-79.
482. Polonsky, W.H. and D. Hessler, *Perceived accuracy in continuous glucose monitoring: understanding the impact on patients*. *J Diabetes Sci Technol*, 2015, 9(2): p. 339-41.
483. Kovatchev, B.P., et al., *Assessing sensor accuracy for non-adjunct use of continuous glucose monitoring*. *Diabetes Technol Ther*, 2015, 17(3): p. 177-86.
484. Reach, G. and C. Choleau, *Continuous glucose monitoring: physiological and technological challenges*. *Curr Diabetes Rev*, 2008, 4(3): p. 175-80.
485. Thome-Duret, V., et al., *Use of a subcutaneous glucose sensor to detect decreases in glucose concentration prior to observation in blood*. *Anal Chem.*, 1996, 68(21): p. 3822-6.
486. Monsod, T.P., et al., *Do sensor glucose levels accurately predict plasma glucose concentrations during hypoglycemia and hyperinsulinemia?* *Diabetes Care*, 2002, 25(5): p. 889-93.
487. Monnier, L., H. Lapinski, and C. Colette, *Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA(1c)*. *Diabetes Care*, 2003, 26(3): p. 881-5.
488. Monnier, L., et al., *The loss of postprandial glycemic control precedes stepwise deterioration of fasting with worsening diabetes*. *Diabetes Care*, 2007, 30(2): p. 263-9.
489. Monnier, L., C. Colette, and D. Owens, *Postprandial and basal glucose in type 2 diabetes: assessment and respective impacts*. *Diabetes Technol Ther*, 2011, 13 Suppl 1: p. S25-32.
490. Papanas, N. and D. Ziegler, *Polynuropathy in impaired glucose tolerance: is postprandial hyperglycemia the main culprit? A mini-review*. *Gerontology*, 2013, 59(3): p. 193-8.
491. Singleton, J.R., et al., *Microvascular complications of impaired glucose tolerance*. *Diabetes*, 2003, 52(12): p. 2867-73.
492. Wolever, T.M., et al., *Variation of postprandial plasma glucose, palatability, and symptoms associated with a standardized mixed test meal versus 75 g oral glucose*. *Diabetes Care*, 1998, 21(3): p. 336-40.
493. Chapelot, D., C. Marmonier, and P. Valensi, *Predicting more accurately the overall glucose response to a lunch meal by using the postprandial glucose peak*. *Metabolism*, 2007, 56(1): p. 37-43.
494. Ceriello, A., *Evidence for an Independent and Cumulative Effect of Postprandial Hypertriglyceridemia and Hyperglycemia on Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress Generation: Effects of Short- and Long-Term Simvastatin Treatment*. *Circulation*, 2002, 106(10): p. 1211-1218.
495. Ceriello, A., et al., *Hyperglycemia counterbalances the antihypertensive effect of glutathione in diabetic patients: evidence linking hypertension and glycemia*

- through the oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 1997, 11(4): p. 250-5.
496. Valensi, P. and E. Cosson, *Hemodynamic changes in postprandial state*. *Diabetes Metab*, 2006, 32 Spec No2: p. 2S37-41.
  497. Horowitz, M., et al., *Gastric and oesophageal emptying in patients with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 1989, 32(3): p. 151-159.
  498. Normand, S., et al., *Influence of dietary fat on postprandial glucose metabolism (exogenous and endogenous) using intrinsically C-enriched durum wheat*. *BJN*, 2001, 86(01): p. 3.
  499. Meier, J.J. and M.A. Nauck, *Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2005, 21(2): p. 91-117.
  500. Meier, J.J., et al., *Excess glycaemic excursions after an oral glucose tolerance test compared with a mixed meal challenge and self-measured home glucose profiles: is the OGTT a valid predictor of postprandial hyperglycaemia and vice versa?* *Diabetes Obes Metab*, 2009, 11(3): p. 213-22.
  501. Singer, D.E., *Screening for Diabetes Mellitus*. *Ann Intern Med*, 1988, 109(8): p. 639.
  502. Mooy, J.M., et al., *Intra-individual variation of glucose, specific insulin and proinsulin concentrations measured by two oral glucose tolerance tests in a general Caucasian population: the Hoorn Study*. *Diabetologia*, 1996, 39(3): p. 298-305.
  503. McCance, D.R., et al., *Which Test for Diagnosing Diabetes?* *Diabetes Care*, 1995, 18(7): p. 1042-1044.
  504. Sievenpiper, J.L., et al., *Dilution of the 75-g oral glucose tolerance test improves overall tolerability but not reproducibility in subjects with different body compositions*. *Diabetes research and clinical practice*, 2001, 51(2): p. 87-95.
  505. Kesse-Guyot, E., et al., *French adults' cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants (SUVIMAX) trial*. *Am J Clin Nutr*, 2011, 94(3): p. 892-9.
  506. Waijers, P.M., E.J. Feskens, and M.C. Ocke, *A critical review of predefined diet quality scores*. *Br J Nutr*, 2007, 97(2): p. 219-31.
  507. Estaquio, C., et al., *Adherence to the French Programme National Nutrition Santé Guideline Score Is Associated with Better Nutrient Intake and Nutritional Status*. *J Am Diet Assoc*, 2009, 109(6): p. 1031-1041.
  508. Kesse-Guyot, E., et al., *Association Between the French Nutritional Guideline-based Score and 6-Year Anthropometric Changes in a French Middle-aged Adult Cohort*. *Am J Epidemiol*, 2009, 170(6): p. 757-765.
  509. Aatola, H., et al., *Lifetime Fruit and Vegetable Consumption and Arterial Pulse Wave Velocity in Adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. *Circulation*, 2010, 122(24): p. 2521-2528.
  510. Blacher, J., et al., *Aortic pulse wave velocity index and mortality in end-stage renal disease*. *Kidney Int*, 2003, 63(5): p. 1852-1860.
  511. Holowatz, L.A., C.S. Thompson-Torgerson, and W.L. Kenney, *The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function*. *J Appl Physiol* (1985), 2008, 105(1): p. 370-2.
  512. Ghantous, C.M., et al., *Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System*. *Int J Endocrinol*, 2015, 2015: p. 534320.
  513. Tesfaye, S., et al., *Vascular risk factors and diabetic neuropathy*. *N Engl J Med*, 2005, 352(4): p. 341-50.
  514. Tesfaye, S., et al., *Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments*. *Diabetes Care*, 2010, 33(10): p. 2285-93.
  515. *Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'*. *Eur Heart J*, 2010, 31(19): p. 2338-50.

516. Schram, M.T., et al., *Increased Central Artery Stiffness in Impaired Glucose Metabolism and Type 2 Diabetes: The Hoorn Study*. *Hypertension*, 2003. 43(2): p. 176-181.
517. Liatis, S., et al., *Cardiac autonomic function correlates with arterial stiffness in the early stage of type 1 diabetes*. *Exp Diabetes Res*, 2011. 2011: p. 957901.
518. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1387-95.
519. Adams, L.A., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study*. *Gastroenterology*, 2005. 129(1): p. 113-21.
520. Cusi, K., *Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications*. *Gastroenterology*, 2012. 142(4): p. 711-725 e6.
521. Villanova, N., et al., *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2005. 42(2): p. 473-80.
522. Brea, A., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(5): p. 1045-50.
523. Volzke, H., et al., *Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis*. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(12): p. 1848-53.
524. Targher, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2005. 54(12): p. 3541-6.
525. Targher, G., et al., *Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease*. *Diabetes Care*, 2006. 29(6): p. 1325-30.
526. Mirbagheri, S.A., et al., *Liver: an alarm for the heart?* *Liver Int*, 2007. 27(7): p. 891-4.
527. Hamaguchi, M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease*. *World J Gastroenterol*, 2007. 13(10): p. 1579-84.
528. Schindhelm, R.K., R.J. Heine, and M. Diamant, *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients*. *Diabetes Care*, 2007. 30(9): p. e94; author reply e95.
529. McKimmie, R.L., et al., *Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study*. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(12): p. 3029-35.
530. Fracanzani, A.L., et al., *Carotid artery intima-media thickness in nonalcoholic fatty liver disease*. *Am J Med*, 2008. 121(1): p. 72-8.
531. Goessling, W., et al., *Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease*. *Gastroenterology*, 2008. 135(6): p. 1935-44, 1944 e1.
532. Haring, R., et al., *Ultrasonographic hepatic steatosis increases prediction of mortality risk from elevated serum gamma-glutamyl transpeptidase levels*. *Hepatology*, 2009. 50(5): p. 1403-11.
533. Poanta, L.I., A. Albu, and D. Fodor, *Association between fatty liver disease and carotid atherosclerosis in patients with uncomplicated type 2 diabetes mellitus*. *Med Ultrason*, 2011. 13(3): p. 215-9.
534. Lee, Y.J., et al., *The relationship between arterial stiffness and nonalcoholic fatty liver disease*. *Dig Dis Sci*, 2012. 57(1): p. 196-203.
535. Meaume, S., et al., *Aortic Pulse Wave Velocity Predicts Cardiovascular Mortality in Subjects >70 Years of Age*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(12): p. 2046-2050.
536. Mitchell, G.F., et al., *Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study*. (1524-4539 (Electronic)).

537. Pannier, B., et al., *Stiffness of Capacitive and Conduit Arteries: Prognostic Significance for End-Stage Renal Disease Patients*. *Hypertension*, 2005, 45(4): p. 592-596.
538. Sutton-Tyrrell, K., et al., *Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults*. *Circulation*, 2005, 111(25): p. 3384-90.
539. Terai, M., et al., *Comparison of Arterial Functional Evaluations as a Predictor of Cardiovascular Events in Hypertensive Patients: The Non-Invasive Atherosclerotic Evaluation in Hypertension (NOAH) Study*. *Hypertension Research*, 2008, 31(6): p. 1135-1145.
540. Willum-Hansen, T., et al., *Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population*. *Circulation*, 2006, 113(5): p. 664-70.
541. Zoungas, S., et al., *Association of carotid intima-medial thickness and indices of arterial stiffness with cardiovascular disease outcomes in CKD*. *Am J Kidney Dis*, 2007, 50(4): p. 622-30.
542. Vlachopoulos, C., K. Aznaouridis, and C. Stefanadis, *Prediction of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality With Arterial Stiffness*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010, 55(13): p. 1318-1327.
543. Sun, K., et al., *Fibrosis and adipose tissue dysfunction*. *Cell Metab*, 2013, 18(4): p. 470-7.
544. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): p. 524-9.
545. Handorf, A.M., et al., *Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression*. *Organogenesis*, 2015, 11(1): p. 1-15.
546. Yasmin, et al., *Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2): p. 372.
547. Kuntze, L.B., et al., *Captopril and lisinopril only inhibit matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity at millimolar concentrations*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 114(3): p. 233-9.
548. Fang, H., et al., *Molecular mechanisms associated with Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptide activity on vascular extracellular matrix remodeling*. *Cardiology*, 2014, 127(4): p. 247-55.
549. Pyke, C., et al., *GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody*. *Endocrinology*, 2014, 155(4): p. 1280-90.
550. Valensi, P., S. Chiheb, and M. Fysekidis, *Insulin- and glucagon-like peptide-1-induced changes in heart rate and vagosympathetic activity: why they matter*. *Diabetologia*, 2013, 56(6): p. 1196-200.

# RÉSUMÉ

## **Introduction**

L'objectif de cette thèse était d'étudier les intégrateurs de risque cardiovasculaire chez des sujets qui représentent le continuum glycémique de la normo-glycémie jusqu'à la découverte du diabète, avant et après un petit déjeuner standardisé. Les paramètres que nous étudions étaient les suivants: l'endothélium, la rigidité artérielle et le système nerveux végétatif ou autonome (SNA).

## **Méthodes**

Dans un premier temps, nous avons mené une étude métabolique en utilisant des holters glycémiques. Ensuite nous avons étudié des sujets normo-glycémiques (NUTRIVASC: NCT01579409) intolérants au glucose (ACCES: NCT01521312) et diabétiques de type 2 avant et après un traitement par insuline (INSUVASC: 01022658). Nous avons étudié aussi le rôle des facteurs dit non classiques avec deux études sur l'association de la rigidité artérielle à la fibrose hépatique et la neuropathie diabétique.

## **Conclusions**

Nos résultats ont montré que la variabilité glycémique est plus forte en présence d'une dysglycémie et augmente avec l'HbA1c. Nous avons retrouvé une bonne corrélation entre la cinétique de la charge orale en glucose et celle d'un petit déjeuner standardisé.

Chez les personnes âgées saines, l'augmentation du débit cardiaque après l'ingestion d'un repas dépend de l'augmentation de la FC sans que cet effet passe par l'inhibition vagale.

Quatre semaines de traitement par insuline améliorait la fonction endothéliale microvasculaire à jeun.

Parmi les patients diabétiques normotendus, ceux avec une neuropathie périphérique étaient deux fois plus susceptibles d'avoir une valeur de VOP > 90ème percentile des valeurs de référence que ceux sans neuropathie.

La fibrose hépatique était corrélée à la rigidité artérielle indépendamment de l'âge et de la PA chez des sujets normotendus.

Notre travail montre l'intérêt des explorations de la phase post-prandiale et l'étude des plusieurs cibles cardiovasculaires pour comprendre les différences de la PA et de la FC.

## **Summary**

### **Introduction**

The primary objective of this thesis was to study, at fasting and during the postprandial period, cardiovascular risk integrators in subjects representing the continuum from normoglycemia to insulin treated type 2 diabetes. We studied the following parameters: endothelial function, arterial stiffness and autonomic nervous system.

### **Methods**

We have (i) conducted a metabolic study in obese subjects with continuous glucose monitoring systems; (ii) studied subjects with normal glycemia (NUTRIVASC: NCT01579409), impaired glucose tolerance (ACCESS: NCT01521312) and (iii) type 2 diabetes before and after insulin treatment (INSUVASC: 01022658); and finally (iv) we studied the association of arterial stiffness with hepatic fibrosis and with diabetic neuropathy.

### **Results**

(i) Glucose variability was higher in the presence of dysglycemia and increased with HbA1c. The kinetics of oral glucose tolerance test compared to a standardized breakfast were well correlated. (ii) In elderly patients without cardiovascular risk factors, the post-prandial increase in cardiac output depended on the increase in heart rate which was not driven by cardiac vagal inhibition; The French National Nutrition Program recommendations had favorable effects on heart rate and myocardial viability. (iii) A 4-week treatment with insulin in addition to metformin improved microvascular endothelial function at fasting. (iv) In normotensive patients with diabetes, those with peripheral neuropathy have a two-fold higher risk for increased arterial stiffness than those without neuropathy. Finally, liver fibrosis correlates with arterial stiffness independently of age and blood pressure in normotensive subjects.

### **Conclusions**

Our work underlines the importance of exploring cardiovascular integrators during post prandial period in healthy subjects and in diabetic patients, according to their diet and their hypoglycemic and anti-hypertensive treatments.