



HAL
open science

Neuropathie diabétique périphérique : réponses vasomotrices

Cecile Reynes

► **To cite this version:**

Cecile Reynes. Neuropathie diabétique périphérique : réponses vasomotrices. Médecine humaine et pathologie. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0721 . tel-03651847

HAL Id: tel-03651847

<https://theses.hal.science/tel-03651847>

Submitted on 26 Apr 2022

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

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



THESE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITE

Ecole doctorale ED 536 Agrosiences & Sciences

Spécialité : Physiologie

Laboratoire Pharm-Ecologie Cardiovasculaire

Présentée par

Cécile Reynès

Neuropathie diabétique périphérique : Réponses vasomotrices

Soutenue publiquement le 19/04/2021 devant le jury composé de :

Mr Paul VALENSI, PU-PH, Hôpital Jean Verdier, APHP

Rapporteur

Mr Guillaume MAHE, PU-PH, CHU de Rennes

Rapporteur

Mme Anne HUMEAU-HEURTIER, PU, Université d'Angers, LARIS

Examinatrice

Mme Antonia PEREZ-MARTIN, PU-PH, CHU de Nîmes

Examinatrice

Mr Matthieu ROUSTIT, PU-PH, Université Grenoble Alpes

Examineur

Mr Yannick KNAPP, MCF, Université d'Avignon, LaPEC

Co-encadrant de thèse

Mme Agnès VINET, PU, Université d'Avignon, LaPEC

Directrice de thèse



Financements et collaborations

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre d'une convention CIFRE signée entre le Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC, EA 4278) de l'Université d'Avignon et la société GC Technology. Un financement national a été octroyé par l'Association Nationale de la Recherche et Technologie (ANRT) afin de permettre la mise en place des travaux.



Le Centre Hospitalier d'Avignon et les médecins investigateurs du service d'endocrinologie et maladies métaboliques ont permis de recruter les patients et de réaliser nos protocoles au sein de leur service.



Le Laser Speckle Contrast Imaging (PeriCam, Perimed, Suède) de la plateforme 3A a été financé par le Fond de Développement Régional Européen, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, le Conseil Départemental du Vaucluse ainsi que par la communauté d'agglomération du grand Avignon.



Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier **Paul Valensi** et **Guillaume Mahé** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse et d'apporter leurs expertises à mes travaux.

Merci à **Anne Humeau-Heurtier** de me faire l'honneur d'être examinatrice de cette thèse et merci à **Antonia Perez-Martin** et **Matthieu Roustit** d'avoir accepté d'examiner mon travail et d'avoir participé aux comités de thèse et à certains de nos projets.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, **Agnès Vinet-Jullian** pour son encadrement, ses conseils avisés, ses cartons jaunes pour mes rendus last-minute et pour sa connaissance incroyable de TOUTE la bibliographie. Vous avez vite compris mon fonctionnement, me laisser de l'autonomie mais pas trop longtemps avant que je m'éparpille, c'est exactement ce qu'il me fallait. Merci de m'avoir soutenue et poussée à améliorer mon travail. Merci pour votre présence à Sítges, sans vous je ne crois pas que j'aurais eu le courage de monter sur l'estrade et faire cette présentation, merci à vous et à Jean-Marie de m'avoir accompagnée.

Merci **Yannick Knapp** pour ton énergie positive et ta cool attitude en toute circonstance. Merci de m'avoir fait relativiser de nombreuses fois quand mon cerveau faisait des nœuds. Même débordé, tu as toujours trouvé un créneau pour faire passer ma thèse en priorité. Sans ton expertise en traitement du signal, ces travaux n'auraient pas vu le jour. Merci pour les trajets partagés entre Marseille et Avignon et les rencontres du soir dans notre pizzeria officielle.

Merci à tous les membres du LaPEC pour la convivialité du laboratoire **Stéphane Nottin**, **Guillaume Walther**, **Catherine Riva**, **Greg Meyer**, **Sandrine Gayard**, **Florence Coste**, **Claire Maufrais**, **Philippe Obert**, **Cyril Reboul** et **Sophie Antoine** pour tes précieux conseils statistiques.

Je remercie les filles du rez-de chaussée, **Natacha**, **Marielle**, **Stéphanie** et **Mercedes**, toujours des sourires quand je passe vous voir et toujours un compliment au passage. C'est un réel plaisir de vous côtoyer.

Merci aux doctorants, **Mathilde** et **Matthieu** qui débutent, je vous souhaite du courage pour finir votre thèse ; **Gaëtan** pour les debriefs foot du lundi matin ; **Justine**, la plus motivée d'entre nous, qui jongle entre la vie de médecin et de doctorante, merci pour les messages de motivation sur la fin. **Antoine**, merci pour l'ambiance et quel ennui quand ton bureau est vide ! **Doria**, merci d'avoir réussi le concours de Cyril, il y a 4 ans et pour ta gentillesse ; **Sydney**, félicitations pour cette dernière ligne droite de folie que toi seule pouvais tenir. **Alexandra**, merci de m'avoir fait une place sur ton canapé dès le début et pour ces longs moments à papoter. Enfin, merci **Jean-Baptiste** d'être venu t'enfermer dans la salle de manip sans fenêtre de l'hôpital, merci pour ta motivation et ta bonne humeur.

Je remercie le **service d'endocrinologie** du **centre hospitalier d'Avignon** de m'avoir ouvert ses portes et permis de recruter des **patients** que je remercie profondément pour leur patience, ils m'ont permis de rester motivée jusqu'au dernier !

Merci à **Ariel** et **Samantha Odriozola**, votre accueil si chaleureux à Barcelone et votre simplicité m'a touchée. Vous nous avez ouvert les portes de NeuroDiab, merci pour votre disponibilité et votre bienveillance.

Merci à **Henrique Silva** pour les échanges et ses conseils sur notre article sur la déclivité.

Merci à **Pascal Rudent** pour avoir suggéré la CIFRE à GC Technology et à son président **Gérard Crépin** sans qui la collaboration n'aurait pas eu lieu. Merci à **Catherine**, **Annabelle**, **Christelle**, **Laurent**, **Jean-Pierre Cervetti** et **Jean-Michel** pour votre soutien. **Fanny** et **Camille**, vos passages ont été salvateurs.

Merci aux amis Marseillais, **Antoine, Sophie, Jean-Rémi, Sylvain, Nicolas et Jérôme** et à ceux qui ont déménagés **Jules, Pauline, Mathieu et Ella** pour toutes nos soirées.

Merci à mes amies de longue date rencontrées sur les bancs universitaires, **Jennifer Clauzier** ces années de STAPS resteront gravées à jamais dans ma mémoire, **Océane Benezech** aux plan X, Y et Z de nos vies. A **Océane Mercier**, sans ton soutien dans ce master Neurosciences je n'aurais jamais fini. Malgré les embûches je ne doute pas que tu soutiendras brillamment ta thèse.

A mes copines de très longue date, **Manon, Fanny, Anaïs**, des terrains de hand à maintenant et à **Sophie Navarro** des après-midi de notre enfance jusqu'à la belle famille que tu as construite aujourd'hui.

Des remerciements spéciaux à mes copines de toujours **Manon, Océanne et Pauline**, notre amitié est presque aussi vieille que nous. Vous étiez là (forcément) quand j'ai appris que j'avais enfin décroché une thèse. Vous avez toujours été à mes côtés même quand nous étions éloignées. Ma vie est riche de tous nos précieux moments. Nos chemins se sépareront probablement encore mais on les fera toujours se croiser. Merci d'être vous tout simplement ♥

Merci à ma belle-famille **Thierry, Françoise et Manon** qui me soutiennent depuis 7 ans déjà !

Merci à ma famille, **Cathy et Nicole** à qui on peut tout raconter, **Philippe et Florence** pour m'avoir accueillie pendant ce Master à Evry comme la fille qui manquait à votre fratrie. **Pascale et Gilles** pour la joie et la bonne humeur que vous partagez. **Flore et Sylvain** pour les repas à bavarder sur l'avenir et à **Elina, Samuel et Coline** pour les après-midi garderie ! Merci à ma tatie **Simone** pour les étés passés à la Chapelle et pour les messages de bonne chance avant chaque période d'examens qui ont plutôt bien marché jusqu'à maintenant ! Merci à **Nounou et Luigi** qui se sont occupés (et s'occupent encore) de nous comme de leurs filles.

Merci à mes cousins **Alexis et Quentin** pour les étés dans le Vercors. A **Maxime et Jérémy**, mes petits frères d'un master parisien et un merci tout particulier à **Vincent**. Je t'ai toujours suivi, on a longtemps débattu sur ce qu'on allait devenir, nous les universitaires de la famille, Mr le futur Docteur je te double sur la ligne d'arrivée !

Enfin, **papa, maman** personne ne croit en moi autant que vous. Vous êtes les parents que tout le monde rêverait d'avoir. Vous nous avez montré ce que c'est de s'investir dans son travail, vous nous avez donné les moyens de réussir. Vous avez toujours soutenu nos choix et aidé à surmonter les échecs. Vous nous avez montré l'importance de la famille et j'espère qu'un jour, je serai comme vous. Merci **maman** d'avoir relu ce manuscrit maintes et maintes fois.

A ma petite **sœur**, merci pour ton soutien infailible. Toujours à l'écoute, prête à me secouer dans les études, le travail, le sport et la vie de tous les jours. Il n'y a pas assez de mots pour décrire le lien entre deux sœurs et je serai toujours là pour toi. Merci pour l'amour que tu me portes et la confiance que tu as en moi ♥

Robin, tu m'as laissée partir à Paris puis tu m'as suivie quand il a fallu. On a vécu la distance, les journées de travail à rallonge, l'achat de l'appartement, le pacs, l'arrivée de Parker. Tellement de temps à désespérer de ne jamais réussir un concours et de ne pas arriver à faire ce que je voulais. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est évidemment grâce à toi. En route vers de nouveaux horizons !

Pour finir, je tiens à remercier mes **grands-parents**, qui ne sont plus là aujourd'hui pour voir ce que je suis devenue. Mes mamies, je vous avais promis d'aller le plus loin possible dans les études et aujourd'hui j'y suis. Papi, merci de nous avoir décroché la lune à la moindre occasion.

Comme un énième bulletin de notes à vous montrer, cette thèse est pour vous.

Publications dans des revues internationales

- **C. Reynès, A. Vinet, O. Maltinti, Y. Knapp (2020)**
Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining wavelet analysis quality: A methodological study, *Microvascular Research* (IF: 2.73)

- **C. Reynès, J-B. Beaume, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, S. Antoine-Jonville, E. Benamo, Y. Knapp, A. Vinet (2021)**
Concomitant peripheral neuropathy and type 2 diabetes impairs post-exercise cutaneous perfusion and flowmotion, *JCEM* (IF: 5.39) *En cours de révision*

- **C. Reynès, A. Perez-Martin, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, H. Silva, Y. Knapp, A. Vinet (2021)**
Mechanisms of venoarteriolar reflex during foot lowering in type 2 diabetes with and without peripheral neuropathy, *Microcirculation in Health and Disease – Biology* (IF: 3.79) *En cours de révision*

- **C. Reynès, F. Latil-Plat, E. Benamo, Y. Knapp, A. Vinet**
Analgesic effect of time varying magnetic field device therapy on painful diabetic neuropathy: preliminary results of a randomized controlled study. (*Etude en cours*)

- **J-B. Beaume, M. Bowen, C. Reynès, L. Chatel, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, Y. Knapp, A. Vinet**
Post-exercise heart rate variability in type 2 diabetes with and without cardiac autonomic neuropathy assessed by statistical parametric mapping. (*Manuscrit en préparation*)

Résumés publiés

- **C. Reynès, F. Latil-Plat, L. Rocher, H. Ennaifer, J-B. Beaume, L. Chatel, Y. Knapp, A. Vinet**
Mixed small-and-large fiber diabetic neuropathy affects microcirculatory response to exercise. Pilot study. *Archives of Cardiovascular Disease – supplements. 2020*

- **J-B. Beaume, M. Bowen, C. Reynès, L. Chatel, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, Y. Knapp, A. Vinet**
Resting and post-exercise heart rate variability in type 2 diabetes with and without cardiac autonomic neuropathy: Preliminary results. *Archives of Cardiovascular Disease – supplements. 2020*

Participation à des congrès

- **Workshop Microcirculation**
2018, Autrans (38), France
- **AFERO (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité)**
2019, Marseille (13), France
- **EASD (European Association for the Study of Diabetes)**
2019, Barcelona, Spain
2020, Virtual Meeting
- **NEURODIAB (Reflexion and Research Group on Diabetic neuropathy)**
2019, Sitges, Spain
2020, Virtual Meeting

Communications orales dans des congrès

- **C. Reynès, Y. Knapp, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, J-B. Beaume, L. Chatel, E. Benamo, A. Vinet**

L'exercice vasodilatateur : un outil de diagnostic précoce pour la neuropathie diabétique ?
Résultats préliminaires.

Doctoriales, Avignon (84), France (2019)

- **C. Reynès, Y. Knapp, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, J-B. Beaume, L. Chatel, E. Benamo, A. Vinet**

Exercise-induced vasodilatation: Early tool to detect diabetic peripheral neuropathy.
Preliminary results.

NeuroDiab (Reflexion and Research Group on Diabetic neuropathy) – Sitges, Spain (2019)

- **C. Reynès, J-B. Beaume, A. Perez-Martin, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, Y. Knapp, A. Vinet**

Spectral analysis of the venoarteriolar reflex in type 2 diabetic with and without peripheral neuropathy.

NeuroDiab (Reflexion and Research Group on Diabetic neuropathy) – Virtual Meeting (2020)

- **J-B. Beaume, M. Bowen, C. Reynès, L. Chatel, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, Y. Knapp, A. Vinet**

Post-exercise heart rate variability in type 2 diabetes with and without cardiac autonomic neuropathy: a statistical parametric mapping.

NeuroDiab (Reflexion and Research Group on Diabetic neuropathy) – Virtual Meeting (2020)

Communications affichées dans des congrès

➤ **C. Reynès, O. Maltinti, A. Vinet, Y. Knapp**

What time recording of skin blood flow is sufficient for correct flowmotion wavelet analysis? Methodological study.

GRRC (Reflexion and Research Group on Cardiology) – Lille, France. (2019) (annexe 1)

➤ **C. Reynès, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, J-B. Beaume, L. Chatel, Y. Knapp, A. Vinet**

Cutaneous blood flow after an acute sub-maximal exercise in type 2 diabetic patients without or with small and/or large fiber neuropathy.

EASD (European Association for the Study of Diabetes) – Virtual Meeting (2020) (annexe 2)

➤ **C. Reynès, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, J-B. Beaume, L. Chatel, Y. Knapp, A. Vinet**

Mixed small- and- large fiber diabetic neuropathy affects microcirculatory response to exercise. PILOT STUDY.

GRRC (Reflexion and Research Group on Cardiology) – Virtual Meeting (2020) (annexe 2)

➤ **J-B. Beaume, C. Reynès, M. Bowen, L. Chatel, F. Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher, Y. Knapp, A. Vinet**

Resting and post-exercise heart rate variability in type 2 diabetes with and without cardiac autonomic neuropathy: preliminary results.

GRRC (Reflexion and Research Group on Cardiology) – Virtual Meeting (2020) (annexe 3)

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	16
INTRODUCTION	19
REVUE DE LITTÉRATURE	23
CHAPITRE I : DIABETE DE TYPE 2 ET COMPLICATIONS ASSOCIEES	24
PARTIE 1. GENERALITES	25
1. <i>Physiopathologie</i>	25
2. <i>Prévalence</i>	26
3. <i>Traitement du diabète de type 2</i>	26
PARTIE 2. COMPLICATIONS	29
1. <i>Macroangiopathies</i>	29
2. <i>Microangiopathies</i>	30
a. <i>Rétinopathie diabétique</i>	30
b. <i>Néphropathie diabétique</i>	31
c. <i>Neuropathies diabétiques</i>	32
PARTIE 3. LA NEUROPATHIE DIABETIQUE PERIPHERIQUE	34
1. <i>Les nerfs périphériques</i>	34
a. <i>Anatomie</i>	34
b. <i>Classification</i>	35
c. <i>Récepteurs cutanés</i>	36
2. <i>Prévalence de la NP</i>	37
3. <i>Physiopathologie</i>	39
a. <i>Facteurs métaboliques</i>	40
b. <i>Facteurs vasculaires</i>	42
c. <i>Dégénérescence axonale</i>	43
4. <i>Symptômes et signes cliniques de la NP</i>	44
5. <i>Complications associées à la NP</i>	48
6. <i>Diagnostic</i>	48
7. <i>Douleur neuropathique</i>	50
a. <i>Prévalence et caractéristiques</i>	50
b. <i>Mécanismes</i>	51
c. <i>Diagnostic de la douleur neuropathique</i>	53
8. <i>Traitements</i>	53

Sommaire

CHAPITRE II : MICROCIRCULATION CUTANEE ET DIABETE DE TYPE 2	55
PARTIE 1. MICROCIRCULATION CUTANEE	56
1. <i>Description</i>	56
a. Généralités sur la microcirculation	56
b. Au niveau de la peau	57
2. <i>Vasomotricité</i>	60
a. Facteurs nerveux	60
b. Facteurs métaboliques	61
c. Autorégulation myogénique	63
3. <i>Méthode d'exploration de la microcirculation cutanée</i>	63
a. Outils de mesure	63
b. Flowmotion	65
PARTIE 2. DYSFONCTIONS MICROCIRCULATOIRES AU REPOS CHEZ LES DIABETIQUES	70
1. <i>Altérations des perfusions cutanées et hypothèses</i>	70
2. <i>Flowmotion : mécanismes explicatifs</i>	72
PARTIE 3. DYSFONCTIONS MICROCIRCULATOIRES EN REPONSE A DIFFERENTS STRESS	74
1. <i>Hyperthermie locale</i>	74
a. Mécanismes chez le sujet sain	74
b. Dysfonctions chez le patient diabétique	76
2. <i>Récupération post-exercice</i>	80
a. Mécanismes chez le sujet sain	80
b. Dysfonctions chez le patient diabétique	83
3. <i>Déclivité</i>	85
a. Description	85
b. Mécanismes chez le sujet sain	86
c. Dysfonctions chez le patient diabétique	87
CHAPITRE III : LES CHAMPS MAGNETIQUES BASSES FREQUENCES	92
1. <i>Généralités</i>	93
2. <i>Effets sur la douleur</i>	95
a. Douleurs articulaires et péri-articulaires	95
b. Effets sur la neuropathie	96
c. Explications des effets sur la neuropathie	100
3. <i>Effets sur la microcirculation</i>	102
a. Chez le sujet sain	102
b. Chez le patient diabétique	104
4. <i>Conclusion sur l'effet des champs magnétiques</i>	107

Sommaire

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES	109
PARTIE 1. OBJECTIFS	110
PARTIE 2. MATERIELS ET METHODES.....	112
1. <i>Patients et critères d'inclusion-exclusion</i>	112
2. <i>Déroulement des études</i>	113
3. <i>Données anthropométriques</i>	117
4. <i>Bilan biologique</i>	117
5. <i>Détection de la neuropathie</i>	117
6. <i>Détection des autres complications du diabète</i>	121
a. <i>La neuropathie autonome cardiaque</i>	121
b. <i>La rétinopathie</i>	121
c. <i>La néphropathie</i>	122
d. <i>L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs</i>	122
7. <i>Evaluation de la qualité de vie et du niveau d'activité physique</i>	122
8. <i>Evaluation de la douleur</i>	123
9. <i>Evaluation de la microcirculation</i>	124
a. <i>Principe de fonctionnement LDF</i>	124
b. <i>Principe de fonctionnement LSCI</i>	127
c. <i>Enregistrement et traitement des données</i>	128
10. <i>Analyse spectrale</i>	130
a. <i>Traitement du signal</i>	130
b. <i>Analyse des données</i>	132
11. <i>Statistiques</i>	133
PARTIE 3. ETUDES RÉALISÉES.....	136
1. <i>Étude 1: Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining Wavelet Analysis quality: A methodological study</i>	137
2. <i>Étude 2: Concomitant peripheral neuropathy and type 2 diabetes impairs post-exercise cutaneous perfusion and flowmotion</i>	147
3. <i>Étude 3: Mechanisms of venoarteriolar reflex during foot lowering in type 2 diabetes with or without peripheral neuropathy</i>	169
4. <i>Étude 4: Analgesic effect of time varying magnetic field device therapy on painful diabetic neuropathy: preliminary results of a double blind randomized controlled study</i>	185
DISCUSSION	206
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	216
BIBLIOGRAPHIE	219
ANNEXES.....	248

Liste des abréviations

ACh	AcétylCholine	MNSI	Michigan Neuropathy Screening Instrument
ADA	American Diabetes Association	NAC	Neuropathie Autonome Cardiaque
AGE	Produits terminaux de la glycation	NDS	Neuropathy Disability Score
AOMI	Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs	NSS	Neuropathy Symptoms Score
ATP	Adénosine TriPhosphate	NO	Monoxyde d'azote (Nitric Oxyde)
AVAs	Anastomoses Arterio-Veineuses	NOS	Nitric Oxyde Synthase
BPI	Brief Pain Inventory	NP	Neuropathie Périphérique
CBF	Cutaneous Blood Flow	PEMF	Champs magnétiques pulsés
cGMP	Cyclic Guanosine MonoPhosphate	PkC	Protéine Kinase C
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide	PPG	PhotoPlethysmoGraphie
CML	Cellule Musculaire Lisse	PU	Perfusions
CPT	Cold Perception Threshold	SNP	Sodium NitroPrusside
CVC	Conduction Vasculaire Cutanée	TcPO₂	Oxymétrie Transcutanée
DAG	DiacylGlycerol	TM6	Test de Marche de 6 minutes
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire	TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid type 1
DN4	Douleur Neuropathique en 4 Questions	VAR	Réflexe veino-artériolaire
DT1	Diabète de Type 1	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
DT2	Diabète de Type 2	VPT	Vibration Perception Threshold
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor	WPT	Warm Perception Threshold
EMF	ElectroMagnetic Fied		
EOR	Espèces Oxygénées Réactives		
EVA	Echelle Visuelle Analogique		
HAS	Haute Autorité de Santé		
HbA1c	Hémoglobine glycuée		
HTA	HyperTension Artérielle		
HPT	Heat Pain Threshold		
IDF	International Diabetes Federation		
IMC	Indice de Masse Corporelle		
LDF	Laser Doppler Flowmeter		
LDI	Laser Doppler Imaging		
L-NAME	L-NG-Nitro arginine methyl ester		
LSCI	Laser Speckle Contrast Imaging		
LTH	Local Thermal Hyperemia		

Liste des figures

Figure 1 : Relation entre macro- et microangiopathies (Orasanu et Plutzky, 2009).....	29
Figure 2 : Présentation des principales neuropathies diabétiques (Gylfadottir et al., 2019).....	32
Figure 3 : Illustration d'une unité nerveuse périphérique (Saffari et al., 2020).....	34
Figure 4 : Représentation schématique du système nerveux périphérique (Vinik et Mehrabyan, 2004).....	35
Figure 5 : Représentation des récepteurs cutanés au niveau de la peau glabre et non glabre (adaptée de Gould, 2018).....	36
Figure 6 : Facteurs impliqués dans la pathogénèse de la NP (Malik and Veves, 2010)	40
Figure 7 : Photo au microscope de capillaires endoneuraux d'une biopsie du nerf sural d'un sujet diabétique sans NP (A) et d'un sujet diabétique avec NP présentant une occlusion des capillaires avec épaissement de la membrane (B) (Cameron et al., 2001).....	43
Figure 8 : Innervation cutanée chez un sujet sain (A) et chez un patient diabétique avec NP petites fibres (B) (Lauria et al., 2009).....	44
Figure 9 : Symptômes en fonction du type de fibres atteintes (Vinik et Mehrabyan, 2004).....	45
Figure 10 : Représentation des modifications nerveuses mises en cause dans la NP douloureuse (Vinik et Mehrabyan, 2004).....	52
Figure 11 : Structure des microvaisseaux (Marieb et al., 2005).....	56
Figure 12 : Représentation de péricytes (Hamilton et al., 2010).....	57
Figure 13 : Structure de la peau (Cracowski and Roustit, 2020)	58
Figure 14 : Principaux mécanismes de contrôles endothélium-dépendant de contraction et relaxation des CML (Hall, 2009).....	61
Figure 15 : Représentation du "capillary steal" avec augmentation du flux dans les AVAs (Sharma et al., 2020) 72	
Figure 16 : Représentation de signaux LDF pendant une hyperthermie locale chez des sujets sains avec infusion de L-NAME pendant le plateau (A) ou dès le début du LTH (B) (Minson et al., 2001).....	75
Figure 17 : Réponse réduite à une hyperthermie locale chez des sujets DT2 par rapport à des sujets sains exprimée en CVC (Sokolnicki et al., 2007)	77
Figure 18 : Réponse microcirculatoire mesurée par LDF sur la pulpe du doigt (symboles noirs) et au niveau de l'avant-bras (symboles blancs) pendant l'exercice et la récupération (Potocnik et al., 2016)	81
Figure 19 : Position déclive du pied (Khiabani et al., 2000)	85
Figure 20 : Réflexe veino-artériolaire lors de la déclivité du pied (Chao et al., 2009).....	86
Figure 21 : Le spectre électromagnétique.....	94
Figure 22 : Effet des EMF sur le relargage de NO dans une culture de cellules dopaminergiques stimulées par LPS (A) et après blocage de la calmoduline par W-7 (B) (Pilla et al., 2013).....	102
Figure 23 : Déroulement de l'étude FLOWMOTION	113
Figure 24 : Déroulement de l'étude NEUROMICRO.....	114

Figure 25 : Déroulement des visites de début et de fin de l'étude PAIN	116
Figure 26 : Photo du NerveCheck pendant le test à la vibration (A) et les tests thermiques (B).....	119
Figure 27 : Von Frey électronique (BIO-EVF4, Bioseb, Vitrolles, France).....	124
Figure 28 : Principe de fonctionnement du LDF (Hoff et al., 2009)	126
Figure 29 : Principe de fonctionnement du LSCI (Perimed).....	127
Figure 30 : Traitement d'un signal microcirculatoire au repos : en Transformée de Fourier (A), en Short Term Fourier Transform (B) et en ondelettes de Morlet (C) (Kvandal et al., 2006)	131
Figure 31 : Spectre de puissance d'un signal de perfusion au repos : représentation Temps-Fréquence (A) et représentation 2D par moyenne temporelle du spectre (B).....	132

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique (HAS, 2012)	31
Tableau 2 : Prévalence de la NP en fonction du critère de diagnostic et de la durée du DT2 dans différentes études	38
Tableau 3 : Caractéristiques, manifestations et examens de chaque type de fibres (Sasaki and Kishimoto, 2020)	46
Tableau 4 : Tests diagnostiques en fonction du type de fibres (Gyfadottir et al., 2019)	49
Tableau 5 : Bilan de la littérature sur le flowmotion pendant LTH chez des patients diabétiques avec ou sans neuropathie	78
Tableau 6 : Bilan de la littérature sur l'évaluation du VAR chez des patients diabétiques avec ou sans neuropathie	89
Tableau 7 : Bilan de la littérature sur l'effet d'un traitement par PEMF sur la douleur chez des patients diabétiques avec neuropathie douloureuse	99
Tableau 8 : Bilan de la littérature sur l'effet d'un traitement par PEMF sur la microcirculation chez des patients diabétiques ou présentant des ulcères	106
Tableau 9 : Construction du score composite utilisé dans l'étude NEUROMICRO selon la définition du consensus de Toronto	120

Introduction

Aujourd'hui, le nombre de personnes diabétiques atteint des niveaux alarmants avec environ 463 millions de diabétiques dans le monde, selon l'International Diabetes Federation (IDF) (Saeedi et al., 2019). C'est un enjeu de santé publique majeur qui représente un fardeau socio-économique pour les systèmes de santé. La prévalence mondiale du diabète de 9,3 % est, malgré les programmes de prévention, en constante augmentation avec une prévision de 700 millions de diabétiques d'ici 2045 d'après l'IDF (Saeedi et al., 2019). La neuropathie périphérique (NP) touchant un diabétique sur deux au cours de sa vie est la complication du diabète la plus répandue (Feldman et al., 2019). En plus des nombreux déficits sensitifs et/ou moteurs qu'elle engendre, elle augmente considérablement le risque de développer des problèmes plus sévères comme les ulcères et amputations (Hartemann and Lozeron, 2015). Compte-tenu du nombre croissant de patients diabétiques, les surcoûts des soins associés à la NP sont eux aussi en forte augmentation. Son diagnostic est donc un enjeu d'utilité publique pour permettre une prise en charge précoce et limiter le développement de complications plus sévères. Malheureusement, 50 % des cas de NP sont asymptomatiques et les signes cliniques, comme la perte de sensibilité, n'apparaissent qu'à un stade avancé de l'atteinte nerveuse (Vinik and Mehrabyan, 2004).

La pathogénèse de la NP est multifactorielle. Elle est principalement liée à l'importance de l'hyperglycémie et à la durée d'évolution du diabète (Lozeron and Kubis, 2015; Shaw and Zimmet, 1999) et aux atteintes microcirculatoires au travers de la dysfonction endothéliale et de l'atteinte des vaisseaux endoneuronaux (Stirban, 2014; Tesfaye et al., 2010). Ces atteintes microcirculatoires participent à la progression de la NP induisant des dysfonctions neurovasculaires précoces dans le continuum du diabète (Orasanu and Plutzky, 2009). A ce jour, les outils de détection de la NP sont basés sur la présence de symptômes ou signes. Pourtant, un article publié dans *The Lancet* en 2016, plaide en faveur d'un test diagnostique simple et pertinent basé sur un examen microvasculaire (Vas and Edmonds, 2016). La microcirculation cutanée, considérée comme représentative de la microcirculation systémique (Holowatz, 2008), est un site privilégié facilement accessible pour mieux comprendre les modifications microvasculaires liées à la NP. En effet, l'analyse de la microcirculation cutanée par Laser Doppler Flowmeter (LDF) est largement utilisée et non-invasive. Cette technique, en plus de mesurer les perfusions cutanées, permet d'observer les mécanismes sous-jacents régulant le flux sanguin : le flowmotion. Cette analyse spectrale est basée sur les variations de flux sanguin dépendantes des oscillations rythmiques spontanées des artérioles. Cependant, le manque de recommandations sur les temps d'enregistrement pour effectuer une analyse fiable du flowmotion est souvent rapporté dans les études (Martini and Bagno, 2018).

Aussi, dans un premier temps, nous avons proposé une recommandation sur le temps d'enregistrement LDF minimum nécessaire pour réaliser une analyse fiable du flowmotion au repos chez des sujets sains.

Des modifications du flowmotion au repos ont été rapportées chez les patients diabétiques selon le niveau de gravité de la NP sans effet sur le niveau de perfusion au repos (Sun et al., 2013). En outre, les variations du flowmotion peuvent précéder l'apparition des indices globaux de complications microangiopathiques chez le diabétique de type 2 (Hamdy et al., 2001; Schmiedel et al., 2007). Pour autant, les travaux de la littérature ayant recours à l'étude du flowmotion pour une analyse comprehensive de la NP restent limités. Son évaluation lors de différents stimuli permettrait la mise en évidence des voies de signalisation altérées ou non chez les patients diabétiques avec ou sans NP.

Par conséquent, nos études 2 et 3 ont exploré les changements microcirculatoires et du flowmotion lors d'un stress hémodynamique (récupération post-exercice) et lors d'un stimulus vasoconstricteur (déclivité du pied) chez des patients diabétiques de type 2 avec ou sans NP.

A ce tableau clinique, peut s'ajouter la présence de douleurs neuropathiques présentes chez 16 à 34 % des patients diabétiques (Abbott et al., 2011). Ces douleurs sont très invalidantes, difficiles à prendre en charge et encore mal comprises (Abbott et al., 2011). Les résultats des traitements médicamenteux classiques sont décevants avec une réduction de 30 % des symptômes pour 50 % des patients qui se plaignent d'effets secondaires (Pop-Busui et al., 2017) d'où une efficacité jugée modérée dans l'ensemble (Martinez et al., 2010). Dès lors, le développement de thérapies alternatives complémentaires est une option sérieuse dans la prise en charge de la douleur. Le traitement par champs magnétiques pulsés (PEMF) gagne de l'intérêt depuis quelques années et son potentiel effet sur la microcirculation fait de lui un candidat solide en complément thérapeutique dans la NP douloureuse (Mert, 2017).

C'est pourquoi notre dernière étude randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo a examiné les effets antalgiques et microcirculatoires, aigus et chroniques, d'un traitement par PEMF chez des patients diabétiques avec NP douloureuse (Etude 4).

Revue de littérature

*Chapitre I : Diabète de type 2 et
complications associées*

Partie 1. Généralités

1. Physiopathologie

Le diabète est défini selon l'Organisation Mondiale de la Santé comme un état chronique d'hyperglycémie causé par un défaut de sécrétion ou d'action de l'insuline. Selon l'American Diabetes Association (ADA), le diabète se définit par une glycémie, dosée à deux reprises, supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) après un jeûne de 8 heures ou lorsque la glycémie est supérieure ou égale à 2 g/l (11,1 mmol/l) sur des prélèvements veineux, 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose. Une hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieure à 6,5 % est aussi considérée comme marqueur diagnostique de diabète puisqu'elle renseigne sur la qualité de l'équilibre métabolique au cours des 2 ou 3 derniers mois (American Diabetes Association, 2014).

Plusieurs types de diabètes existent :

- le **diabète de type 1** (DT1) ou insulino-dépendant est une maladie auto-immune qui se caractérise par la destruction des cellules β pancréatiques censées produire l'insuline. Il est d'origine génétique bien que les facteurs environnementaux et nutritionnels soient aussi mis en cause et représente 5 à 10 % des cas de diabètes (Daneman, 2006). Le DT1 peut survenir à tout moment de la vie mais il est généralement diagnostiqué autour de 5-7 ans ou à la puberté (Atkinson et al., 2014).
- le **diabète gestationnel** est caractérisé par une intolérance au glucose pendant la grossesse et représente environ 7 % des grossesses dans le monde (ADA, 2004).
- d'**autres diabètes** plus rares existent, comme le diabète MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young), le diabète mitochondrial ou secondaire à une altération du pancréas (chirurgie, substances chimiques, médicamenteuses).
- le **diabète de type 2** (DT2) ou non insulino-dépendant représente 90 % des diabètes. Il se caractérise par l'incapacité de l'organisme à répondre correctement à la sécrétion d'insuline et/ou par une production insuffisante d'insuline par le pancréas. L'histoire naturelle du diabète se fait en trois étapes : l'insulino-résistance, l'hyperinsulinisme et l'insulino-déficience. L'insulino-résistance se caractérise par la réduction de l'action biologique de l'insuline au niveau des tissus cibles (cellules musculaires, hépatiques et adipeuses) provoquant l'élévation de la glycémie. La phase d'hyperinsulinisme compensatoire consiste en une surproduction d'insuline via les cellules β pancréatiques afin de parvenir à réguler la glycémie. A cette étape, la glycémie peut être normale.

Cette surproduction peut durer dix à vingt ans, provoquant l'épuisement du pancréas et la déficience de sécrétion d'insuline laissant place à l'hyperglycémie chronique caractéristique du diabète (Grimaldi, 2010). Le DT2 est une maladie chronique complexe qui résulte de l'interaction gènes-environnement. L'avancée en âge, l'inactivité physique et l'obésité constituent les principaux facteurs de risque du DT2.

2. Prévalence

Selon l'IDF, en 2019, **463 millions de personnes sont atteintes de diabète dans le monde**, ce qui correspond à une augmentation de 62 % en 10 ans (285 millions en 2009). Cette aggravation est liée majoritairement au changement de mode vie plus sédentaire, à l'alimentation plus riche en calorie, au vieillissement de la population et d'autres facteurs encore inconnus. Il est important de noter que l'amélioration du diagnostic et la détection précoce du diabète ont contribué à l'augmentation de cette prévalence.

Le diabète fait aujourd'hui partie des 10 maladies qui provoquent le plus de décès dans le monde. Elle est décrite comme une pandémie puisque les chiffres ne cessent de croître avec une prédiction de 700 millions de diabétiques d'ici 2045 selon l'IDF et ce, malgré les programmes de prévention. En Europe, plus de 59,3 millions de personnes sont traitées pour le diabète en 2019, soit 6,3 % de la population (Saeedi et al., 2019). La prévalence du diabète est de 9,6 % au niveau mondial et de 5 % en France en 2019 (soit 4,5 millions de français). Il faut savoir que près de 50 % des diabétiques ne sont pas diagnostiqués au niveau mondial et pourrait à l'échelle de la France représenter 1 million de personnes.

Les hommes sont légèrement plus touchés que les femmes (prévalence de 9,6 et 9 % respectivement). La fréquence du diabète augmente avec l'âge ; dans la tranche d'âge 65-79 ans, la prévalence du diabète est de 19,9 %, soit 111,2 millions de personnes. Elle est aussi plus élevée dans les pays riches (10,4 %) que dans les pays pauvres (4 %).

3. Traitement du diabète de type 2

Du fait de la prévalence et du fardeau économique de cette maladie, il y a un besoin important de thérapies efficaces afin de gérer au mieux le diabète et ses complications. Le traitement du DT2 se fait dans un but de prévention, de ralentissement de la progression des complications et de maintien de la qualité de vie en prenant en compte tous les risques qu'entraîne la maladie. Aujourd'hui, le diabète représente 12 % des dépenses de santé mondiale, soit environ 727 milliards de dollars selon l'IDF (Saeedi et al., 2019).

D'après les estimations de l'assurance maladie en 2014 en France, les dépenses de santé pour la prise en charge des diabétiques s'élevaient déjà à 10 milliards d'euros par an représentant plus de 5 % des dépenses de santé. Si l'on regarde le détail de ces dépenses, la prise en charge spécifique du diabète ne représente que 2,3 milliards d'euros en comprenant les médicaments (1,1 milliard d'euros). Le reste des dépenses, soit 7,7 milliards d'euros, correspond au traitement des complications associées au diabète (cécité, pied diabétique, amputation, etc...) (Rapport CNAM, 2017).

La base de la prise en charge des diabétiques concerne la gestion du mode de vie avec la mise en place de règles hygiéno-diététiques. L'éducation du patient sur l'équilibre diététique, la perte de poids, l'activité physique régulière et le sevrage tabagique sont fondamentaux et démontrent, dès lors que le patient s'implique, des améliorations métaboliques et un meilleur contrôle glycémique (Balducci et al., 2017).

Le traitement du diabète passe par la prise d'**antidiabétiques oraux** qui peuvent stimuler la sécrétion de l'insuline (sulfamides) et/ou potentialiser son effet (biguanides). On peut associer plusieurs antidiabétiques oraux et augmenter leur posologie jusqu'à atteindre une glycémie correcte. Si le contrôle glycémique n'est pas satisfaisant ($HbA1c > 8\%$), les patients passent sous **insulinothérapie** qui peut se composer d'une ou plusieurs injections d'insuline journalières. Enfin, si le contrôle n'est toujours pas satisfaisant malgré l'injection quotidienne de plusieurs doses d'insuline à action rapide, les médecins peuvent proposer, sous réserve de non contre-indications, l'implantation d'une **pompe à insuline** qui va libérer continuellement des doses d'insuline en sous-cutanée (Weissberg-Benchell et al., 2003). Même si ce dispositif est une avancée majeure dans la prise en charge diabétique, il est coûteux et reste majoritairement prescrit pour les DT1. Quoiqu'il en soit, la pompe n'enlève pas la surveillance accrue de la glycémie qui est une charge quotidienne pour les patients. Celle-ci doit être prise environ 4 fois par jour généralement avant les repas. Le test de glycémie s'effectue par piqûre au bout du doigt permettant de récupérer une goutte de sang et de connaître la glycémie capillaire en direct. Ces piqûres peuvent être douloureuses et provoquent à long terme une perte de sensibilité. La mise sur le marché de capteurs glycémiques à coller sur le bras a considérablement amélioré la vie des personnes diabétiques qui peuvent désormais connaître leur glycémie en temps réel en scannant simplement ce capteur. En plus, il enregistre automatiquement la glycémie toutes les 15 minutes et ces données peuvent être téléchargées et transmises aux médecins qui suivent la variabilité glycémique de leur patient.

Cette variabilité glycémique est un outil exceptionnel de plus en plus utilisé par les praticiens avec des informations sur l'évolution de la glycémie postprandiale, les excursions au cours de la journée et le nombre d'hypoglycémie (Danne et al., 2017).

Malgré les avancées technologiques dans la prise en charge du diabète, cela reste une maladie insidieuse dont la guérison est peu probable même si l'étude SOS (Swedish Obese Subjects) a démontré un taux de rémission de 72,3 %, deux ans après une chirurgie bariatrique chez des DT2 obèses (Sjöström et al., 2014).

Finalement, quel que soit le traitement mis en place, l'objectif principal est la régulation de la glycémie d'autant plus que plusieurs études ont démontré qu'un bon contrôle glycémique permet de diminuer l'incidence des complications microvasculaires (Nathan et al., 2015, UKPDS, 1998).

Partie 2. Complications

L'hyperglycémie chronique est responsable d'altérations au niveau du système vasculaire qui jouent un rôle crucial dans le développement des complications liées au diabète. Elles peuvent être divisées en deux parties (Figure 1) :

- Les **macroangiopathies** : atteinte des vaisseaux de moyen à gros calibre.
- Les **microangiopathies** : atteinte des petits vaisseaux d'un diamètre < 150 µm

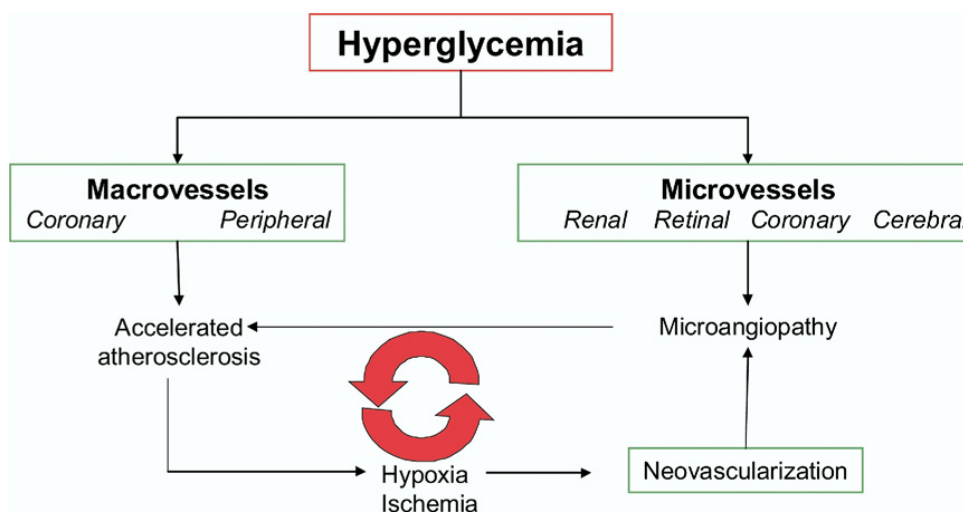


Figure 1 : Relation entre macro- et microangiopathies (Orasanu et Plutzky, 2009)

1. Macroangiopathies

La macroangiopathie est définie comme l'atteinte des artères de moyen à gros calibre. Elle est causée par la sclérose des vaisseaux (athérosclérose) secondaire à un dépôt d'athérome formant des plaques à l'intérieur des vaisseaux. Ces plaques d'athérome entraînent un rétrécissement des artères. Lorsqu'elles se détachent, les plaques peuvent former un caillot risquant d'obstruer totalement l'artère. Le rétrécissement de la lumière vasculaire vient aussi d'une prolifération endothéliale et d'une médiocalcose (calcification et dégénérescence de la tunique moyenne des vaisseaux). Les artères les plus touchées sont les artères du cou, du cœur et des jambes.

- Au niveau du système nerveux central

Le risque d'accident vasculaire cérébral avec ses conséquences est considérablement augmenté dans la population diabétique. En 2005, l'étude GCNKSS (Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study) estimait que 25 % des accidents vasculaires cérébraux étaient causés par le diabète ou par son association avec l'hypertension artérielle (HTA) (Kissela et al., 2005).

- **Au niveau du cœur**

Les complications cardiovasculaires provoquées par le diabète sont une cause majeure de mortalité. En effet, 65 % des décès de patients diabétiques y sont liés (Deshpande et al., 2008). A cause de l'athérosclérose, les patients diabétiques souffrent d'insuffisance coronaire, d'ischémie myocardique et ont un risque d'infarctus du myocarde augmenté par rapport à la population générale (Maranta et al., 2020).

- **Au niveau périphérique**

L'Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs (AOMI) consiste en la sténose (rétrécissement de la lumière) des artères des jambes. La réduction du flux sanguin au niveau de la jambe et surtout du pied augmente le risque de gangrène et diminue la capacité de cicatrisation lors d'une plaie due à la réduction des apports nécessaires. L'AOMI augmente donc considérablement le risque d'amputation au niveau du pied (Jude et al., 2001). Elle concerne 20 à 30 % des diabétiques sur la base d'un index de pression artérielle cheville/bras < 0.9 (Marso and Hiatt, 2006). Les facteurs de risque de l'AOMI sont le tabagisme, l'HTA, la sévérité et la durée du diabète.

2. Microangiopathies

L'atteinte des micro-vaisseaux est la complication la plus fréquente du diabète. Ces vaisseaux (artérioles, capillaires et veinules) ont pour fonction de réguler le flux sanguin dans des zones telles que les extrémités, les reins et les yeux. En condition d'hyperglycémie, leur paroi s'altère et la capacité de régulation est perdue, provoquant des dommages dans les territoires concernés.

a. Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique est la première cause de cécité chez l'adulte. Sa prévalence est plus importante chez les DT1 que les DT2, respectivement 77.3 % et 25.2 % (Yau et al., 2012). C'est une atteinte des yeux due à la perte des péricytes qui entourent les capillaires rétiens, ayant pour rôle la régulation du flux sanguin. Ceci augmente la perméabilité des capillaires et l'éclatement des vaisseaux rétiens provoquant des microanévrismes. Elle peut être de forme non-proliférative avec des petites zones d'hémorragies et d'ischémies ou proliférative, c'est-à-dire qu'il y a prolifération de néovaisseaux de manière anarchique au niveau de la rétine. Cette dernière forme est la plus grave.

Le suivi ophtalmologique est systématique dans la prise en charge du diabète et le contrôle annuel comprend une mesure de l'acuité visuelle et un examen du fond d'œil après dilatation pupillaire permettant d'observer la présence d'œdèmes, d'hémorragies et/ou la prolifération de vaisseaux anormaux caractéristiques de la rétinopathie proliférative (HAS, 2010).

b. Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est la première cause de dialyse en Europe (Roussel, 2011). En 2004, l'assurance maladie estimait que 28,5 % des dialysés en France étaient diabétiques. La néphropathie est une atteinte de la filtration glomérulaire causée par la glomérulosclérose et l'expansion du mésangium (matrice entourant les capillaires) concourant à une perte de perméabilité et favorisant le passage de l'albumine. Cette protéinurie est caractéristique des modifications structurales des glomérules rénaux. La mesure du débit de filtration glomérulaire (DFG) est le paramètre servant de diagnostic et de suivi de la néphropathie. Il est généralement calculé selon la formule CKD-EPI (Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration) plus précise que l'ancienne formule MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) et décrit 5 stades d'évolution de la maladie rénale (Tableau 1).

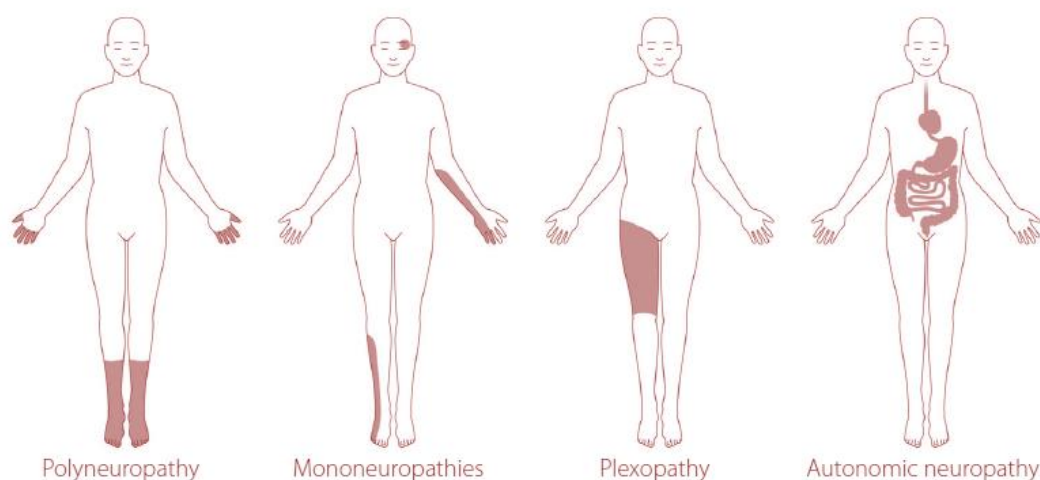
Tableau 1 : Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique (HAS, 2012)

Stade	DFG (mL/min/1,73 m ²)	Définition
1	≥ 90	Maladie rénale chronique* avec DFG normal ou augmenté
2	Entre 60 et 89	Maladie rénale chronique* avec DFG légèrement diminué
3A	Entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
3B	Entre 30 et 44	
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	< 15	Insuffisance rénale chronique terminale

*DFG, débit de filtration glomérulaire; * Avec marqueurs d'atteinte rénale : albuminurie, hématurie, leucocyturie, ou anomalies morphologiques ou histologiques, ou marqueurs de dysfonction tubulaire, persistant plus de 3 mois (et à deux ou trois examens consécutifs).*

D'autres marqueurs peuvent aussi être utilisés pour prédire la néphropathie diabétique comme la microalbuminurie qui correspond à un rapport albumine/créatinine supérieur à 30 mg/g. Ces deux critères sont surveillés au moins une fois par an et plus lorsque la protéinurie est importante.

c. Neuropathies diabétiques



- Neuropathie autonome

La neuropathie autonome est la complication la moins bien diagnostiquée du diabète. Elle peut toucher n'importe quel système organique contrôlé par le système nerveux autonome et engendrer des troubles digestifs, sexuels ou mictionnels.

Au niveau cardiaque, la Neuropathie Autonome Cardiaque (NAC) se définit comme une affection d'origine métabolique des terminaisons nerveuses du système nerveux autonome à destination du cœur et des vaisseaux. Elle est responsable d'un déséquilibre de la balance sympatho-vagale, d'anomalies de régulation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Elle est reconnue comme un risque de développement de la fibrillation auriculaire, d'insuffisance et d'arythmie cardiaque possiblement associées à une ischémie myocardique silencieuse (Valensi et al., 2001). La prévalence de la NAC est compliquée à déterminer en fonction des tests et critères utilisés pour la détecter, mais il est clair qu'elle augmente avec la durée du diabète, l'âge et un mauvais contrôle glycémique (Pop-Busui, 2010). Les symptômes répertoriés de la NAC sont la tachycardie au repos, l'hypotension posturale, l'intolérance à l'exercice, une incidence accrue d'ischémie asymptomatique et une diminution du taux de survie après un infarctus du myocarde (Vinik and Ziegler, 2007).

- **Mononeuropathies focales ou multifocales**

Ces neuropathies sont rares et se résolvent parfois en quelques mois. Ce sont des atteintes isolées d'un ou plusieurs nerfs, en particulier, au niveau des cuisses (crural ou sciatique), des bras (radial, cubital ou ulnaire) ou encore de certains nerfs crâniens. Elles peuvent provoquer des déficits moteurs ou sensitifs ainsi qu'une amyotrophie locale (Boulton et al., 2005).

- **Neuropathie périphérique (NP)**

C'est la neuropathie la plus répandue chez les sujets diabétiques. On estime qu'un diabétique sur deux développera une NP au cours de sa vie (Feldman et al., 2019). Elle provoque des troubles sensitifs dus à la dégénérescence des petites et/ou grosses fibres nerveuses. La NP est longueur-axonale dépendante touchant donc majoritairement les membres inférieurs (Tesfaye et al., 2010). La NP est, avec l'AOMI, le plus grand facteur de risque d'amputation du pied. En effet, la diminution de la sensibilité augmente les risques de microtraumatismes au niveau du pied et le développement de plaies. Les angiopathies diabétiques diminuent la capacité de cicatrisation, ces plaies peuvent alors s'infecter et mener jusqu'à l'amputation.

Le développement de ces complications dépend de nombreux facteurs pouvant induire une ou plusieurs des complications précédemment citées. En effet, il a été démontré que la NP, et notamment une altération au niveau des petites fibres, est corrélée avec la NAC (Pafili et al., 2019). Plus récemment, il a été montré que la mesure des fonctions des petites fibres avec le Neuropathy Disability Score (NDS) est un excellent outil pour exclure la présence de NAC chez des DT2 (Pafili et al., 2020). La NP est aussi associée à la présence de rétinopathie et de néphropathie (Dyck et al., 1993) et ce, même lors d'une NP nouvellement diagnostiquée, démontrant des mécanismes pathologiques communs entre les microangiopathies (Tesfaye et al., 2005).

Partie 3. La neuropathie diabétique périphérique

Elle est la plus répandue des neuropathies, définie par l'ADA comme étant une atteinte nerveuse, symétrique, longueur-axonale dépendante liée aux troubles métaboliques et microcirculatoires du diabète (Tesfaye et al., 2010). Elle représente 90 % des cas de neuropathies et se distingue par une altération symétrique et bilatérale des nerfs au niveau des parties distales des membres inférieurs (Gautier et al., 1997).

1. Les nerfs périphériques

a. Anatomie

Le nerf périphérique est composé d'un ensemble de fascicules au sein desquels se regroupent plusieurs milliers de fibres nerveuses (Figure 3). L'**épinèvre** est constitué de fibres de collagènes orientées longitudinalement et de quelques fibres élastiques qui réalisent le revêtement le plus externe du nerf. Il possède également des cellules adipeuses à sa surface ainsi que des lymphocytes, des fibres nerveuses et des vaisseaux. Le **périnèvre** délimite chaque fascicule et est constitué de couches de cellules périneurales d'origine fibroblastique, elles-mêmes séparées par des faisceaux de collagène. L'**endonèvre** correspond au tissu conjonctif intrafasciculaire, il est constitué par une trame lâche élastique de fibres de collagène contenant des mastocytes, des fibroblastes et un réseau capillaire dense appelé **vasa nervorum**. Ce réseau vasculaire est primordial pour assurer les besoins métaboliques des nerfs. Le vasa nervorum est lui-même innervé par des fibres amyéliniques sympathiques végétatives (vasoconstrictrices) et parasymphatiques (vasodilatatrices) pour réguler au mieux la vascularisation du nerf (Rigoard et al., 2009).

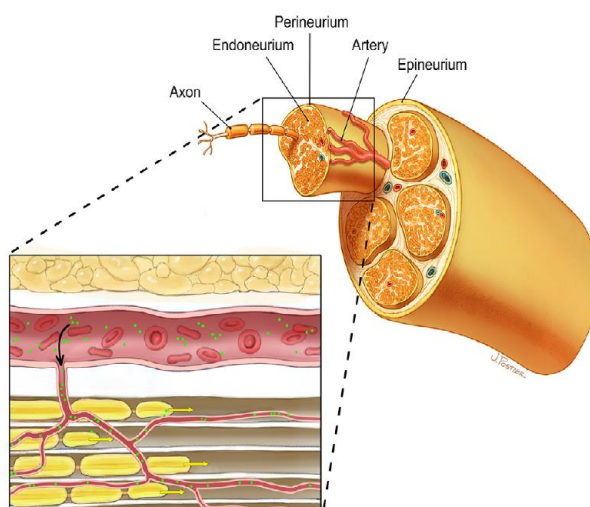


Figure 3 : Illustration d'une unité nerveuse périphérique (Saffari et al., 2020)

b. Classification

Il existe des fibres nerveuses motrices et sensibles qui sont classées selon leur rôle. Le diamètre des fibres et leur vitesse de conduction du signal dépendent de l'épaisseur de la gaine de myéline qui les entoure. Sur cette gaine de myéline, on trouve alternativement des cellules de Schwann enroulées autour de l'axone qui ont un rôle de protection et des nœuds de Ranvier par lesquels le message nerveux est propagé de manière saltatoire. Les terminaisons nerveuses se retrouvent au niveau de la peau et peuvent être divisées en 4 classes (Roosterman et al., 2006) (Figure 4) :

- **Fibres A α** très myélinisées (\varnothing 12-22 μ m) avec une vitesse de conduction très rapide (70-120 m/s) associées aux contrôles musculaires et tendineux,
- **Fibres A β** moyennement myélinisées (\varnothing 6-12 μ m) avec une vitesse de conduction rapide (30-70 m/s) et sensibles au toucher, à la pression et la vibration,
- **Fibres A δ** peu myélinisées (\varnothing 1-5 μ m) avec une vitesse de conduction modérée (4-30 m/s) qui sont sensibles à la température,
- **Fibres C (nociceptives)** non myélinisées (\varnothing 0,2–1,5 μ m) à conduction lente (0,5–2 m/s) sensibles à la douleur. Elles représentent 60 à 90 % des fibres sensibles cutanées (Körei et al., 2016; Le Bars and Adam, 2002).

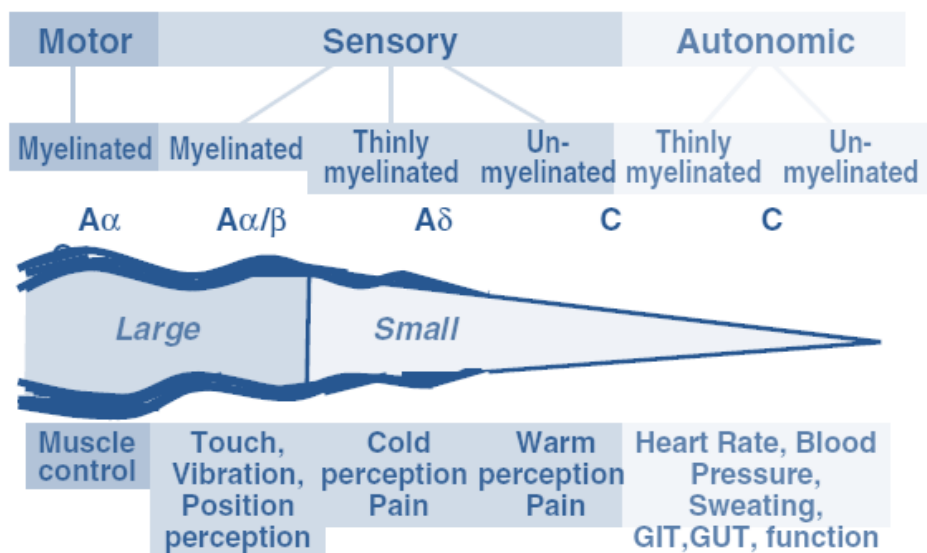


Figure 4 : Représentation schématique du système nerveux périphérique (Vinik et Mehbarian, 2004)

c. Récepteurs cutanés

Au niveau de la peau, les fibres nerveuses ont soit des terminaisons libres comme les fibres C, soit des récepteurs encapsulés.

Il existe différentes modalités sensorielles transmises par ces différents récepteurs (Figure 5) :

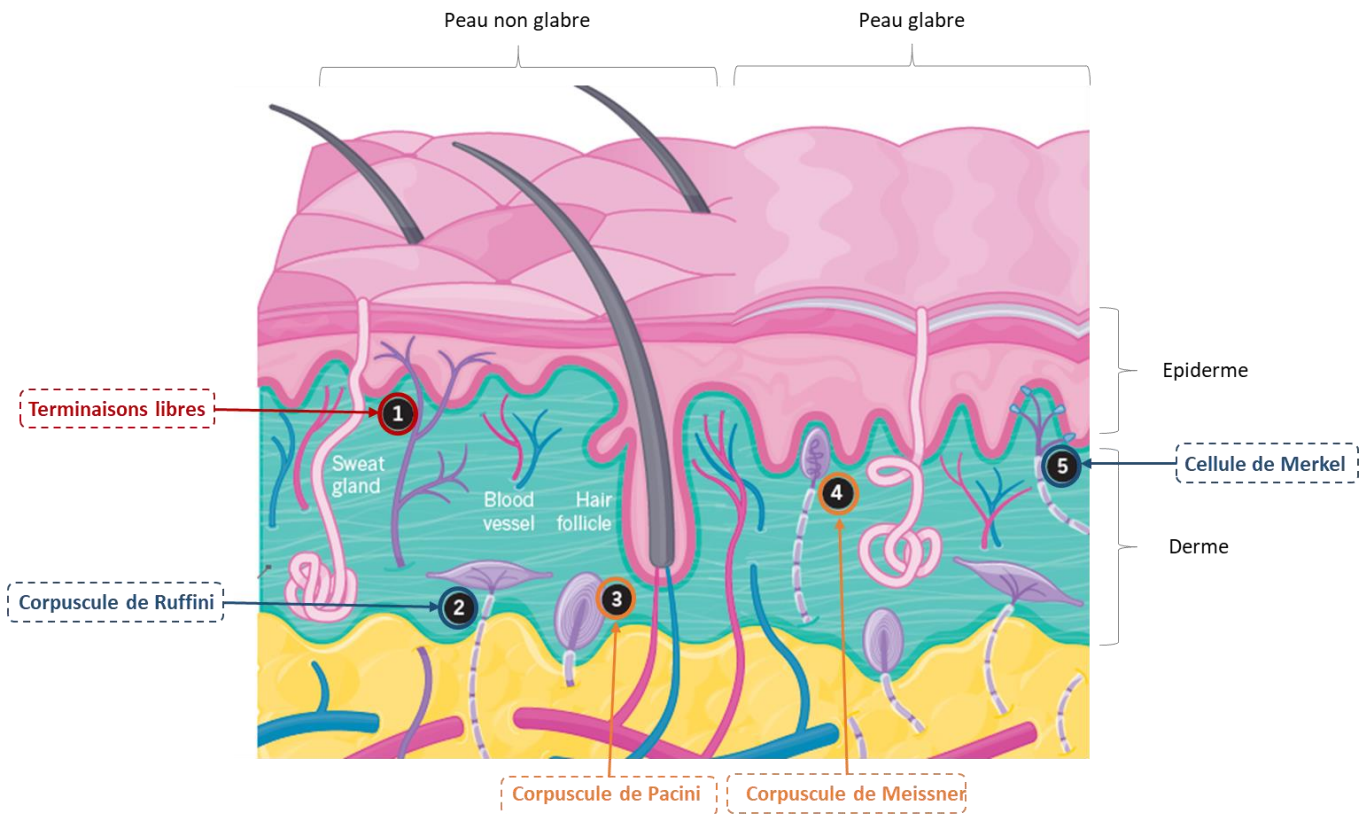


Figure 5 : Représentation des récepteurs cutanés au niveau de la peau glabre et non glabre (adaptée de Gould, 2018)

- La sensibilité mécanique :

- à la **pression** transmise par les disques superficiels de **Merkel** et par les corpuscules de **Ruffini** plus profonds,
- à la **vibration** transmise par les corpuscules de **Meissner** situés dans les papilles dermiques et les corpuscules de **Pacini** logés dans l'hypoderme,
- au **toucher** transmise par les **terminaisons libres** et les **récepteurs des follicules pileux** sensibles à l'inclinaison du poil.

Ces récepteurs sont associés aux **fibres A β** .

- La **sensibilité thermique** est transmise par les **terminaisons nerveuses libres**, proches des capillaires sanguins. Les récepteurs au **froid** sont liés à des **fibres A δ** et sont localisés dans l'épiderme. Les récepteurs au **chaud** sont liés à des **fibres C** et sont localisés plus profondément dans le derme.
- La **sensibilité douloureuse** est essentiellement transmise par des **terminaisons libres**. Ces terminaisons sont polymodales et répondent à la fois à des stimuli nociceptifs **mécaniques** comme la piqûre, le pincement ou la torsion via les **fibres A δ** mais aussi, à des stimuli nociceptifs **thermiques** au froid (< 10 °C) et au chaud (> 45 °C) ou **chimiques** (présence d'agents toxiques externes ou substances produites par les tissus lésés) via les **fibres C**.

En plus de ces terminaisons nerveuses, il existe des récepteurs membranaires qui peuvent être impliqués dans la transmission de stimuli nociceptifs. Nous nous concentrerons ici sur **TRPV1** (Transient Receptor Potential Vanilloid type 1) qui semblerait être impliqué dans le développement de douleurs neuropathiques (Danigo et al., 2013; Malek et al., 2015).

TRPV1 est fortement exprimé au niveau des fibres A δ et C mais on le retrouve aussi au niveau des kératinocytes de la peau (Nagy et al., 2004). Il a été démontré qu'il est impliqué dans la transduction de stimuli nociceptifs thermiques (> 43 °C) et mécaniques ; par ailleurs, il jouerait aussi un rôle dans les processus inflammatoires (Danigo et al., 2013).

2. Prévalence de la NP

Aujourd'hui, les auteurs s'accordent à dire que la NP touchera plus de **50 % des DT2** au cours de leur vie (Yorek et al., 2018; Feldman et al., 2019) et qu'elle est déjà présente chez un DT2 sur 10 au moment du diagnostic du diabète (Pafili et al., 2018). Comme présenté dans le tableau 2, la prévalence de la NP dépend des critères de diagnostic établi mais aussi de la durée du DT2. Même si l'on peut observer des prévalences de NP différentes dans les 5 premières années du diabète (18 à 50 %, Tableau 2), il est clair qu'avec des durées d'évolution au-delà de 15 ans, environ 50 % des patients sont atteints d'une NP. Les hommes semblent plus touchés que les femmes (respectivement 52.6 et 46.2 % de prévalence), ceci pouvant s'expliquer par le fait que la NP touche plus les personnes de grande taille (Cheng et al., 2006). Enfin, les sujets plus âgés ont une prévalence de la NP plus élevée que les sujets jeunes expliquée par la durée de la maladie qui augmente avec l'âge.

Tableau 2 : Prévalence de la NP en fonction du critère de diagnostic et de la durée du DT2 dans différentes études

Auteurs/ Journal	Cohorte	Critères diagnostic	Prévalence NP	Durée DT2
Young et al., 1993 Diabetologia	3949 DT2	NDS \geq 6	20.8 %	< 5 ans
		NDS \geq 3 et NSS \geq 5	50 %	25 ans
Tesfaye et al., 2005 The new england journal of medicine	EURODIAB	Présence d'au moins 2 des critères suivants : - Présence \geq 2 symptômes - Absence \geq 2 réflexes achilléen ou rotulien - Seuil de perception anormale à la vibration	28 %	12 ans
Jaiswal et al., 2007 Diabetes Care	SEARCH	MNSI > 2	22 %	5 ans
Pop-Busui et al., 2009 Journal of the peripheral nervous system	BARI 2D	MNSI > 2	43 %	< 5 ans
			55.5 %	> 15 ans
Charles et al., 2011 Diabetes Care	ADDITION	Monofilament 10 g	20.3 %	5 ans
		Sensibilité Vibratoire	25.7 %	
		10 g + Vibration	34.8 %	
Lee et al., 2015 Diabetes Care	PROMISE	MNSI > 2	50 %	3 ans
Ziegler et al., 2015 Journal of diabetes and its complications	PROTECT	Au moins 1 des 3 tests anormal : - Monofilament 10 g - Sensibilité thermique - Sensibilité vibratoire	55.6 %	/
Gylfadottir et al., 2019 Pain	DD2	MNSIq \geq 4	18 %	4.6 ans

NDS, Neuropathy Disability Score; NSS, Neuropathy Symptom Score ; MNSI, Michigan Neuropathy Screening Instrument ; MNSIq, MNSI questionnaire

La symptomatologie de la NP et les signes cliniques n'apparaissent qu'à un stade déjà évolué de l'atteinte nerveuse (Vinik et al., 2013), et plus de 50% des cas de NP peuvent être asymptomatiques (Vas and Edmonds, 2016). Pour exemple, l'étude PROTECT a démontré que parmi les DT2 avec détection de NP, 61.5 % n'avaient pas été diagnostiqués auparavant (Ziegler et al., 2015). L'enjeu d'un outil de diagnostic précoce prend alors tout son sens pour la mise en œuvre d'une prise en charge plus efficace, permettant de limiter le développement de complications plus sévères conduisant au pied diabétique.

3. Physiopathologie

La NP est dégénérative, elle cible principalement les neurones sensitifs mais peut s'étendre aux neurones moteurs. Les mécanismes qui conduisent à affecter préférentiellement un type de nerfs plutôt qu'un autre restent encore méconnus (Feldman et al., 2019). La pathogénèse de la NP diabétique est **multifactorielle** et est principalement liée à l'importance de l'hyperglycémie et à la durée d'évolution du diabète (Lozeron et al., 2015; Siemionow, 2004). Parmi les facteurs de risques classiques, l'hypertension artérielle et l'obésité ont été démontrées comme corrélées à la neuropathie petites fibres (Smith and Singleton, 2013; Callaghan et al., 2018). L'origine de la NP est d'une part, **métabolique** par l'implication de plusieurs voies cellulaires (voie des polyols, voie des produits de glycation terminaux, voie de la protéine kinase C (Pkc), stress oxydant) responsables d'une toxicité nerveuse (Said, 2007) et d'autre part, **vasculaire** au travers de la dysfonction endothéliale et de l'atteinte des vaisseaux endoneuraux. Tous ces dérèglements induisent une hypoxie endoneurale et l'altération des nerfs périphériques.

Cependant, la temporalité entre tous ces mécanismes reste encore débattue. Il semblerait que les désordres métaboliques soient à l'origine des désordres vasculaires (Figure 6) (Malik and Veves, 2005; Vinik, 1999) mais il a aussi été démontré que la dysfonction endothéliale pouvait à elle seule expliquer la NP (Bönhof et al., 2019; Chapouly et al., 2016). La NP résulte donc certainement d'interactions complexes entre toutes ces dysfonctions.

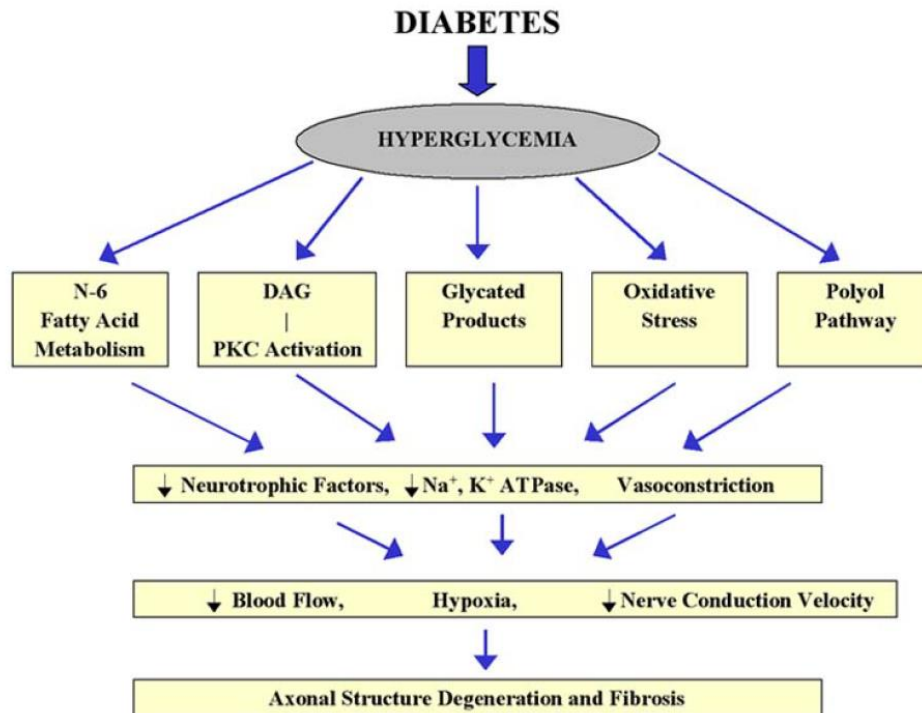


Figure 6 : Facteurs impliqués dans la pathogénèse de la NP (Malik and Veves, 2010)

DAG, Diacylglycerol; PkC, Protéine Kinase C; Na⁺, Sodium; K⁺, Potassium; ATP, Adenosine TriPhosphate.

a. Facteurs métaboliques

- Suractivation de la voie des polyols

En condition d'hyperglycémie, le glucose entre dans les nerfs grâce aux transporteurs du glucose (GLUT3) multipliant par 4 sa concentration et augmentant l'activité de l'aldose réductase dans le nerf, transformant le glucose en fructose et en sorbitol (Tomlinson and Gardiner, 2008). Le sorbitol étant en compétition avec le myo-inositol sur son récepteur membranaire, la concentration endoneurale en myo-inositol diminue induisant une réduction de la production d'inositol triphosphate et de diacylglycérol (DAG). La diminution du DAG réduit l'activité de la pompe Na/K⁺ (sodium-potassium) impliquée dans le maintien du potentiel membranaire et permet la conduction d'un message nerveux. Cette baisse d'activité diminue la vitesse de conduction nerveuse (Siemionow, 2004). Enfin, la diminution du DAG réduit son activité régulatrice sur la voie de la PkC.

- **Activation de la voie PkC**

La voie de la PkC est principalement stimulée par l'hyperglycémie mais aussi par le stress oxydant, l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et la diminution du DAG. Son activité modifie la réactivité vasculaire en diminuant la réponse vasodilatatrice au NO (Monoxyde d'azote) et en augmentant la sensibilité à l'angiotensine II (vasoconstrictrice). Elle modifie également l'expression de substances vasoconstrictrices telles que les prostaglandines (PG) et l'endothéline-1 (ET-1). Les vaisseaux endoneuraux sont donc dans un état de vasoconstriction permanent, diminuant le flux sanguin au niveau du nerf, première étape avant l'hypoxie (Das Evcimen and King, 2007).

- **Anomalies du métabolisme des acides gras essentiels**

La transformation de l'acide linoléique (ω -6) en acide arachidonique, qui est un composant majeur des phospholipides des parois du vasa nervorum, est considérablement diminuée chez les sujets diabétiques (Cameron et al., 2001). Ceci modifie l'ordre lipidique membranaire baissant la résistance cellulaire à des conditions d'ischémie et le fonctionnement de la pompe Na/K⁺. De la même manière que pour la voie des polyols, la vitesse de conduction nerveuse est diminuée. La diminution de ces acides gras polyinsaturés réduit la production de prostacycline vasodilatatrice concourant donc à réduire le flux sanguin endoneural (Siemionow, 2004).

- **Augmentation de la glycation non-enzymatique des protéines**

La glycation est une réaction naturelle entre le glucose et une protéine. En cas d'hyperglycémie, les produits terminaux de glycation (AGE) s'accumulent et se fixent à leurs récepteurs induisant une dysfonction vasculaire. Celle-ci modifie les propriétés fonctionnelles des protéines, rendant la membrane cellulaire plus perméable ou indirectement en générant des espèces oxygénées réactives (EOR) (Siemionow, 2004). Ces AGE ont été retrouvés au niveau de l'endonèvre et du périnèvre des microvaisseaux ; leur expression au niveau axonal était corrélée avec la sévérité de la perte axonale (Veves and Malik, 2008).

- **Stress oxydant et inflammation**

Le diabète augmente la production de EOR par le statut inflammatoire général de l'organisme et via les différentes voies présentées précédemment. En condition non pathologique, la voie des polyols produit des antioxydants endogènes mais elle est saturée par l'excès de glucose dans le diabète. L'aldose réductase en transformant le glucose en sorbitol, grâce au NADH (nicotinamide adénine dinucléotide), produit des ions hydrogène (H⁺). L'auto-oxydation du glucose est aussi une

source de production de EOR qui affecte l'endothélium et altère certaines de ses fonctions en réagissant avec le NO (Cameron et al., 2001).

La fixation des AGE à leurs récepteurs produit aussi des EOR et il a été démontré chez le rat que la présence de EOR affecte le flux sanguin endoneural et la conduction nerveuse (Bönhof et al., 2019). L'environnement endoneural dans un état de stress oxydant constant altère aussi la fonction mitochondriale des neurones et des cellules de Schwann provoquant une démyélinisation et une dégénérescence axonale (Said, 2007).

L'idée qu'un processus inflammatoire serait impliqué dans le développement de la NP est en train d'émerger. Chez l'animal DT2, il a été démontré une profonde dysrégulation des processus inflammatoires et immuns qui pourraient contribuer aux altérations microvasculaires et notamment, au niveau des nerfs (Bönhof et al., 2019). Des études chez l'homme sont nécessaires pour confirmer l'implication de l'inflammation dans le développement de la NP.

b. Facteurs vasculaires

Toutes ces voies finissent par affecter le vasa nervorum et la circulation environnante des nerfs par le biais de plusieurs mécanismes :

- l'augmentation de l'expression d'agents vasoconstricteurs (Lam, 2001),
- la dysfonction endothéliale et la diminution de synthèse et de sensibilité vasculaire au NO,
- l'augmentation de la réponse myogénique,
- l'augmentation de la perméabilité vasculaire,
- l'altération des parois vasculaires ne pouvant plus assurer leur rôle de régulation du flux sanguin local.

Ainsi, le flux neurovasculaire est diminué avec une baisse de l'extraction des substrats et de l'oxygène et a pour conséquence une diminution de l'ATP (adénosine triphosphate) intraneuronal, une augmentation des EOR et l'activation de voies pro-inflammatoires (Østergaard et al., 2015). Dans les stades précoces de la NP, il a pu être noté une angiogenèse transitoire qui s'estompe avec l'augmentation du statut ischémique (Malik et al., 2005).

Au cours du temps, la perfusion dans les **capillaires endoneuraux** est diminuée (Beggs et al., 1992) jusqu'à leur **occlusion** totale (Figure 7) aboutissant à une condition d'**hypoxie** nerveuse (Cameron et al., 2001; Dyck et al., 1985). Parmi les acteurs impliqués dans cette détérioration du vasa nervorum, Desert Hedgehog exprimé par les cellules de Schwann de la gaine de myéline est une piste prometteuse. En effet, il a été démontré, chez des souris déficientes en Desert Hedgehog,

une détérioration de la barrière entre sang et nerfs périphériques caractéristique de la microangiopathie et le développement des symptômes de la NP (Chapouly et al., 2016).

Par ailleurs, il avait déjà été démontré que des injections de Sonic Hedgehog (protéine de la voie de signalisation Hedgehog) chez des rats diabétiques améliorait l'angiogenèse et restaurait la fonction nerveuse (Kusano et al., 2004).

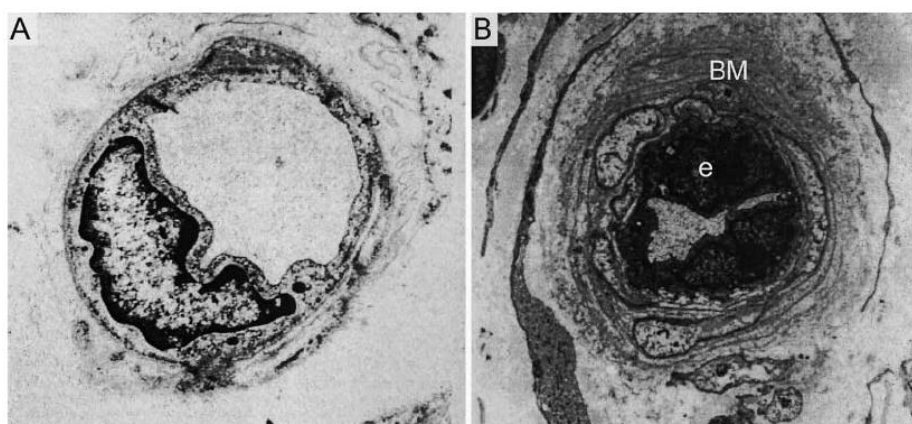


Figure 7 : Photo au microscope de capillaires endoneuraux d'une biopsie du nerf sural d'un sujet diabétique sans NP (A) et d'un sujet diabétique avec NP présentant une occlusion des capillaires avec épaissement de la membrane (B) (Cameron et al., 2001)

Ces altérations neurovasculaires apparaissent précocement dans le continuum du diabète et avant l'apparition des symptômes de la NP (Malik et al., 2005; Orasanu and Plutzky, 2009). Elles peuvent être à elles seules la cause des dysfonctions nerveuses sans implication des altérations métaboliques (Cameron et al., 2001). Pour autant, des interactions entre ces facteurs existent mais restent très complexes.

c. Dégénérescence axonale

L'atteinte neuropathique est la résultante d'une dégradation des structures qui composent le système nerveux périphérique. Au cours du temps, l'hypoxie endoneurale engendre un amincissement de la paroi des vaisseaux endoneuraux et leur raréfaction (Beggs et al., 1992). Malik et al. ont constaté une **perte de la myéline** et une diminution du diamètre axonal (Malik et al., 2005). En effet, les axones se démyélinisent par segment avec la perte progressive des cellules de Schwann (Schwannopathie) diminuant la protection des axones qui ne résistent plus aux conditions d'hypoxie et finissent par disparaître (Gonçalves et al., 2018). En ce sens, il a été démontré une

diminution des fibres nerveuses amyéliniques intra-épidermiques dans la NP (Figure 8) (Lauria and Devigili, 2007).

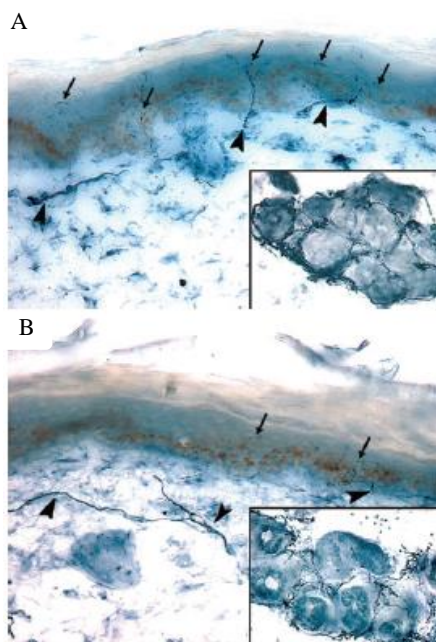


Figure 8 : Innervation cutanée chez un sujet sain (A) et chez un patient diabétique avec NP petites fibres (B) (Lauria et al., 2009)

4. Symptômes et signes cliniques de la NP

La NP touche les extrémités distales puisqu'elle est longueur-axonale dépendante et évolue en « chaussettes » et en « gant » remontant progressivement le long des membres. Cependant, les atteintes au niveau des mains n'arrivent qu'à un stade très avancé de la NP alors que les pieds et les jambes montrent les premiers signes de la maladie.

On parle très souvent de NP « petites fibres » puisqu'elles représentent entre 60 et 90% des nerfs périphériques (Körei et al., 2016; Quattrini et al., 2004) et que les premiers symptômes rapportés concernent leurs fonctions comme des **paresthésies**, des **hypo- ou hyperesthésies**, des sensations de **brûlures** et des **douleurs** lancinantes (Figure 9). Cependant, il n'est pas rare que les « grandes fibres » soient aussi touchées ($A\alpha$ et $A\beta$) avec des déficits moteurs et des troubles sur les réflexes tendineux. Certains auteurs pensent que l'atteinte des petites fibres précède l'atteinte des grosses fibres (Körei et al., 2016; Malik, 2019). Il a aussi été démontré dans une étude récente que

l'atteinte spécifique d'un type de fibres était peu commune mais que l'atteinte conjointe des petites et larges fibres représentait 74 % des patients diabétiques avec NP (Galosi et al., 2020).

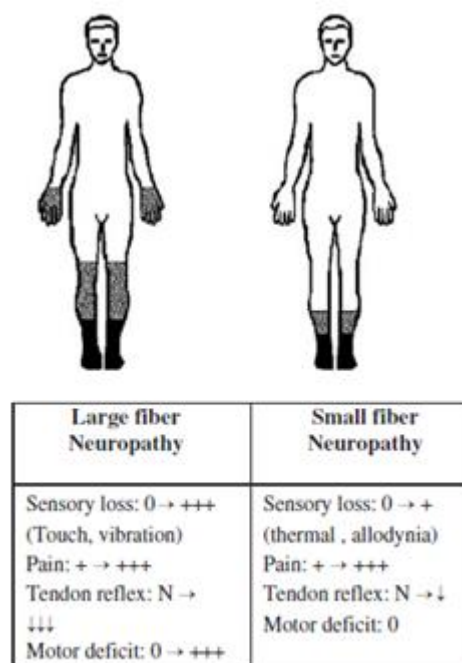


Figure 9 : Symptômes en fonction du type de fibres atteintes (Vinik et Mehrabyan, 2004)

La **classification** peut donc être faite en fonction du type de fibres affectées mais elle a longtemps été faite selon les stades de Dyck : 0 - Pas de NP ; 1 - NP asymptomatique ; 2 - NP symptomatique ; 3 : NP handicapante (Dyck, 1988). Aujourd'hui, les outils de diagnostic ont changé et le pourcentage élevé de NP asymptomatique (50 %) a permis de faire évoluer la classification lors du **consensus de Toronto** (Tesfaye et al., 2010) :

- **NP possible** : présence de symptômes OU de signes de NP (engourdissement, picotement, brûlures) au niveau des orteils, pied ou jambe OU diminution de la sensibilité distale OU absence de réflexe achilléen,
- **NP probable** : présence d'une combinaison d'au moins deux symptômes et signes de NP,
- **NP infraclinique** : conduction nerveuse anormale OU mesure validée d'atteinte des petites fibres SANS signes ou symptômes de NP,

Chapitre 1 : Diabète de type 2 et complications associées

- **NP confirmée** : présence d'une conduction nerveuse anormale avec symptômes OU signes de NP. Si la conduction nerveuse est normale, présence d'une mesure validée d'atteinte des petites fibres.

La classification selon le consensus de Toronto est encore aujourd'hui la référence. Cependant, de nombreux auteurs s'intéressent à l'atteinte spécifique des petites fibres faisant évoluer le spectre des NP. En effet, les tests permettent de détecter les atteintes de plus en plus précocement et on peut désormais classer les atteintes en fonction de chaque type de fibres (Tableau 3). La progression d'un type de NP à l'autre (petites puis larges fibres) n'est pas clairement établie.

Par exemple, dans l'analyse de Sasaki et Kishimoto, on distingue l'atteinte spécifique des petites fibres et la neuropathie sensorielle qui touche les petites et larges fibres (Sasaki and Kishimoto, 2020).

Tableau 3 : Caractéristiques, manifestations et examens de chaque type de fibres (Sasaki and Kishimoto, 2020)

Classification		Manifestations		Validated examinations			Possible clinical course of DPN Pre-DM ⇒ DM ⇒⇒ longstanding DM		
Fiber type Diameter:μm	Functions	Symptoms	Signs (Simple test)	QST NCS	Pathology Morphology	Magnetic Resonance Neurography	Diabetic small fiber neuropathy (DSFN)	Diabetic sensory neuropathy (DSN)	Advanced DSN
C-fiber Unmyelinated 0.2-1.5	Nociceptor Warmth receptor	Burning pain		Warmth detection	IENFD CCM		Small fibers are affected, but large fibers are not.	Some painful cases, but also cases with raised pain thresholds.	Some painful cases, but also cases with raised pain thresholds.
Aδ-fiber Myelinated 1-5	Nociceptor Cold/hot receptor	Electric Stabbing Tingling pains	Pinprick	Hot/Cold detection Pinprick	IENFD CCM	T2w-high lesion	Burning pain in some case, but may be asymptomatic.	Morphological fiber loss does not relate to pain	Morphological fiber loss does not relate to pain
Aβ-fiber Myelinated 6-12	Mechano- receptor Vibration Pressure	Numbness Tingling (painless)	Tuning fork MF (10-g)	QVT MF SNCS	Sural nerve biopsy	T2w-high lesion T2w-low lesion		Numbness and/or painless tingling in some cases.	Numbness in some cases. Reduced ATR, impaired vibration or tactile sense, abnormal SNCS, loss of protective sense can exist
Aα-fiber Myelinated 13-20	Proprio- ception Golgi tendon organ	Instability	ATR	ATR SNCS	Sural nerve biopsy	T2w-high lesion		Reduced ATR, impaired vibration or tactile sense, abnormal sensory NCS can exist.	
Aα-fiber Myelinated 13-20	Motor function	Muscle weakness	Manual muscle testing	MNCS		T2w-high lesion T2w-low lesion			Abnormal MNCS Muscle atrophy ⇒ foot ulcer

DPN, diabetic polyneuropathy; DM, diabetes mellitus; QST, quantitative sensory testings; NCS, nerve conduction study; MRN, magnetic resonance neurography; IENFD, intra-epidermal nerve fiber density; CCM, confocal

Chapitre I : Diabète de type 2 et complications associées

corneal microscopy; T2w, T2 weighted; QVT, quantitative vibration threshold; MF, monofilament; SNCS, sensory nerve conduction study; ATR, Achilles tendon reflex; MNCS, motor nerve conduction study. High or low lesion means hyperintense or hypointense lesion, respectively.

5. Complications associées à la NP

Le principal risque avec la perte de sensation dans la NP est le développement de plaies chroniques et d'**ulcères**, d'autant plus que la microangiopathie joue un rôle majeur dans la dégradation tissulaire et diminue la capacité de guérison des plaies (Chao and Cheing, 2009). L'**ulcère du pied diabétique** est la première cause d'hospitalisation chez le patient diabétique mais surtout la première cause d'**amputation** non-traumatique du membre inférieur chez l'adulte (Jude et al., 1999). Selon l'IDF, une amputation est pratiquée toutes les 30 secondes et est la conséquence directe du diabète (IDF Atlas, 2019).

Le **pied de Charcot** est une neuroarthropathie progressive présente chez 16 % des patients présentant une NP (Cavanagh et al., 1994). Elle se caractérise par des modifications osseuses et articulaires liées à des lésions neurologiques sous-jacentes. Des micro-fractures se développent au cours de la marche mais restent indolores à cause de la perte de sensibilité. A long terme, cela entraîne des déformations du pied augmentant les risques de maux performants et le développement d'**ulcères** (Hartemann and Lozeron, 2015).

La détection précoce de la NP, à un stade préclinique, est d'une importance capitale pour le clinicien afin de limiter le développement de complications plus sévères et la morbidité qui y est associée (Sasaki and Kishimoto, 2020). L'IWGDF (International Working Group on the Diabetic Foot) recommande l'évaluation de la NP pour prévenir le risque podologique chez tous les diabétiques (Bus et al., 2016).

6. Diagnostic

Le diagnostic de la NP est primordial et de nombreux questionnaires et tests existent. La définition de la NP selon le consensus de Toronto laisse la possibilité à chacun de construire son propre score combiné entre plusieurs outils. Ceci explique en partie les différences de prévalence de la NP (Tableau 2) et c'est pourquoi, il est parfois difficile de comparer les résultats obtenus entre les différentes études. Pour autant, le dépistage de la NP est fondé sur la recherche de symptômes (questionnaires, interrogatoires) et sur la présence de signes comme une atteinte des petites ou larges fibres (tests sensoriels quantitatifs).

En routine, le **Monofilament 10 g** est le test le plus utilisé. Il permet de tester la sensibilité mécanique mais il est très opérateur dépendant et détecte une perte de sensibilité déjà sévère (Dros et al., 2009).

Le **diapason 128 Hz** se place au niveau dorsale de l'articulation inter phalangienne de l'hallux pour tester la sensibilité vibratoire et est plus sensible que le Monofilament pour prédire la survenue de la NP (Meijer et al., 2005). Cependant, ces deux tests sont reconnus pour prédire l'ulcération du pied mais ils sont peu sensibles pour détecter précocement la NP.

L'utilisation de questionnaires est aussi très répandue. Le **NSS** (Neuropathy Symptoms Score) est basé sur la présence de symptômes par interrogation du patient et le **NDS** est basé sur des tests cliniques (perception vibratoire, sensibilité au chaud et au froid, pinprick et réflexe achilléen). Ce sont deux scores qui, associés, permettent de diagnostiquer la NP avec une sensibilité de 71,1 % et une spécificité de 90 % (Chawla et al., 2013).

Le **MNSI** (Michigan Neuropathy Screening Instrument) couple un questionnaire de 15 questions et un examen des pieds comprenant leur état général, la perception de la vibration et le réflexe achilléen. Un score ≥ 7 au questionnaire et un score ≥ 2 à l'examen démontre la présence d'une NP (Feldman et al., 1994).

L'**électrophysiologie** est une manière objective et sensible de mesurer la NP. En effet, la mesure de la **conduction nerveuse** au niveau des nerfs de la jambe est très utilisée pour confirmer la présence de NP. Le problème, c'est qu'elle représente uniquement l'activité des larges fibres myélinisées (Tableau 4). C'est pourquoi il est important d'associer plusieurs tests pour affirmer la présence de NP et il existe de nombreux outils que sont les **tests sensoriels quantitatifs**. Ils sont aujourd'hui très recommandés car ils permettent d'objectiver la sensibilité thermique (fibres A δ), douloureuse (fibres C) ou mécanique et vibratoire (A β) et ce, sur différentes régions. Cependant, ces tests sont dépendants des réponses des sujets et de leur implication.

	Large fiber neuropathy	Small fiber neuropathy
Symptom	Numbness, tingling, gait instability	Burning pain, electrical shock, stabbing pain
Examination	Reflexes, proprioception, vibration	Temperature, pinprick sensation
Function	Pressure, balance, muscle strength	Pain sensation, protective sensation
Diagnostic test	<ul style="list-style-type: none"> • Nerve conduction studies • DPN Check™ (point-of-care device assessing sural nerve conduction) • Neurothesiometer • Vibrometer • Tuning fork (128 Hz) 	<ul style="list-style-type: none"> • Quantitative sensory testing (QST) • Intradermal nerve fiber structure • Cornea confocal microscopy • Laser Doppler imaging after noxious stimulus • Sudomotor function • Skin conductance measurement • Microneurography

Tableau 4 : Tests diagnostiques en fonction du type de fibres (Gyfadottir et al., 2019)

Des options plus coûteuses et invasives permettent d'affirmer la présence de NP comme la **biopsie** de nerfs ou de peau et la **microscopie confocale**, mais celles-ci restent majoritairement utilisées en recherche clinique. Des études au niveau du nerf sciatique par IRM (Imagerie par résonance magnétique) ont corrélé les lésions détectées à la sévérité de la NP et à la diminution de fonction des fibres sensibles (Groener et al. 2020; Pham et al., 2015).

Finalement, la technique du **LDI-Flare** basée sur la réponse neurovasculaire a été démontrée comme un marqueur précoce d'une atteinte des fibres C chez les patients DT2 (Krishnan and Rayman, 2004). Ce test consiste à chauffer la peau du pied grâce à une sonde thermostatique et à observer la taille du flare (réponse hyperémique) par un Laser Doppler Imaging (LDI). Ce test, basé sur une réponse microcirculatoire à un stress, renforce l'intérêt de l'étude de la microcirculation et de ses mécanismes de contrôles.

7. Douleur neuropathique

La douleur neuropathique est définie par l'IASP (International Association for the Study of Pain) comme « une douleur causée par une lésion ou maladie du système nerveux somatosensoriel » (Jensen et al., 2011). Le consensus de Toronto précise pour la NP douloureuse que c'est une « douleur survenant en conséquence directe d'anomalies du système somatosensoriel périphérique chez les personnes atteintes de diabète » (Teskaye et al., 2010).

a. Prévalence et caractéristiques

La prévalence de ces **douleurs neuropathiques** est estimée entre **16 et 34 % des patients présentant une NP** (Abbott et al., 2011). Davies et al. ont confirmé que la NP douloureuse est présente pour un tiers des patients présentant une NP (Davies et al., 2006). Dans une cohorte de 766 patients DT1 et DT2, Bouhassira et al. ont trouvé qu'un patient diabétique sur cinq souffre de douleurs chroniques liées à la NP, parmi ceux-là, 72 % sont DT2 et 48 % sont des femmes (Bouhassira et al., 2013). Une étude récente a montré que les facteurs de risque pour le développement d'une NP douloureuse sont les mêmes que la NP non douloureuse et qu'il existe une corrélation entre sévérité de la NP et la présence de douleur. En effet, il a été rapporté que la perte sensitive est plus importante chez les patients avec NP douloureuse (Gylfadottir et al., 2019).

La douleur neuropathique se caractérise par des douleurs lancinantes et incessantes au niveau des jambes depuis au moins 3 mois. Les patients se plaignent de sensations de **brûlures** sous les pieds, de **piqûres**, de **décharges électriques** et d'**hypersensibilité** au toucher (Iqbal, 2018).

Ces douleurs sont exacerbées la nuit (Vinik, 1999) ce qui diminue la qualité de sommeil, la qualité de vie et augmente le risque de dépression (Gore et al., 2004). Ces symptômes sont associés à une dysfonction des petites fibres notamment des fibres C (Körei et al., 2016; Vinik and Mehrabyan, 2004).

La douleur est un ressenti subjectif et résulte de mécanismes complexes tels que la perception de l'influx sensoriel, l'humeur et le comportement du sujet qui dépend de facteurs sociétaux et environnementaux (Alam et al., 2020).

La compréhension des mécanismes de la douleur neuropathique et sa prise en charge est primordiale quand on sait que la mortalité à 10 ans est plus élevée chez les diabétiques avec NP douloureuse que les NP non douloureuses (Torrance et al., 2010).

b. Mécanismes

Les mécanismes explicatifs de l'apparition de douleur chez un tiers des diabétiques avec NP ne sont pas clairement identifiés. Il y a une implication de **mécanismes périphériques** et de **mécanismes centraux** (Tesfaye et al., 2005).

Parmi les mécanismes périphériques, il se pourrait que les dommages nerveux modifient l'expression des canaux sodium et leur accumulation, au niveau de la lésion, génèrerait des **potentiels d'action ectopiques** hyperstimulant les neurones des ganglions rachidiens dorsaux. Les canaux calciques pourraient aussi augmenter le relargage de substance P modulant la douleur au niveau de la corne dorsale (Aslam et al., 2014). En plus, il a été démontré une **augmentation de l'expression de TRPV1** (canal responsable de l'entrée du calcium (Ca^{2+}) provoquant la dépolarisation des cellules) sur des modèles expérimentaux de douleurs neuropathiques (Malek et al., 2015).

Après la dégradation de certains nerfs périphériques, les nerfs restants pourraient aussi diminuer leur seuil d'activation et devenir hypersensibles (**phénomène de facilitation**) pour protéger une région sous-innervée (Feldman et al., 2019; Rosenberger et al., 2020). Cette hypothèse est aussi rapportée par Vinik et Mehrabyan qui ont suggéré que l'apparition de la douleur neuropathique pourrait être due à une sensibilisation périphérique et une suractivation des fibres A β et A δ pour compenser la perte des fibres C nociceptives (Figure 10). Cette suractivation induirait un **remodelage au niveau du système nerveux central** provoquant une allodynie (interprétation douloureuse de stimuli périphériques classiques par exemple : toucher, exposition au froid, etc...).

Enfin, quand les fibres C disparaissent, un remodelage synaptique pourrait intervenir, permettant aux fibres sensibles restantes de relayer le message aux neurones secondaires des ganglions rachidiens dorsaux et à la région spécifique de la douleur du système nerveux central.

La mort des fibres nociceptives serait alors enregistrée par le cortex. Cette situation semble être le début d'un état de douleur chronique sans nécessairement de stimulation périphérique (Vinik and Mehrabyan, 2004).

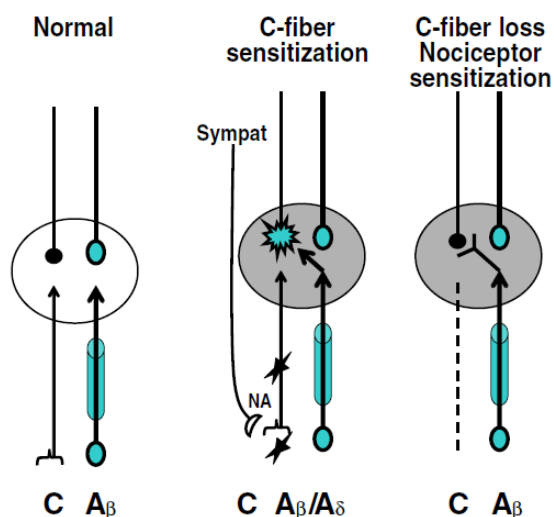


Figure 10 : Représentation des modifications nerveuses mises en cause dans la NP douloureuse (Vinik et Mehrabyan, 2004)

Il a aussi été démontré une atrophie corticale au niveau du cortex somatosensoriel et de l'insula mais aussi la présence de connexions corticales inhabituelles dans le réseau somatomoteur chez les patients souffrant de NP douloureuse (Selvarajah et al., 2018a, 2018b). L'exagération des douleurs la nuit pourrait venir du **remodelage des régions responsables du traitement de la douleur** au niveau du système nerveux central.

D'autres pistes ont été suggérées dans le développement d'une NP douloureuse. Par exemple, il semble que l'atteinte des fibres C joue le rôle principal dans la survenue de la douleur. Pourtant, il n'a pas été noté de différence du nombre de NP douloureuse chez des patients avec des atteintes purement petites, larges fibres ou des deux types de fibres conjointement (Galosi et al., 2020). Pour finir, Doupis et al. ont constaté une **augmentation** des niveaux de CRP (protéine C-réactive) et sICAM (soluble intercellular adhesion molecule), deux **marqueurs inflammatoires** chez des sujets avec NP et encore plus en cas de NP douloureuse (Doupis et al., 2009).

Des **niveaux de vitamine D diminués** chez les patients avec NP douloureuse par rapport à NP non douloureuse ont aussi été rapportés. Ceci pourrait être directement lié à son activité sur les ganglions rachidiens des petites fibres ou par l'association d'une déficience en vitamine D avec d'autres facteurs de risque de la NP comme l'HTA ou la dyslipidémie (Shillo et al., 2019).

c. Diagnostic de la douleur neuropathique

Le questionnaire **DN4** « Douleur neuropathique en 4 questions » autour de 10 items est validé chez les personnes diabétiques permettant de confirmer la présence de la NP et de douleurs neuropathiques chroniques dans la même région (Bouhassira et al., 2005). Ce questionnaire démontre une sensibilité de 80 % et une spécificité de 92 % (Spallone et al., 2012).

Le questionnaire **PainDETECT** permet d'identifier une composante neuropathique dans la douleur et démontre une sensibilité de 61 % et une spécificité de 92 % chez les sujets DT2 (Themistocleous et al., 2016).

La présence de douleurs neuropathiques a aussi des impacts sur la qualité de vie et a des retentissements émotionnels qui peuvent être évalués par le questionnaire **BPI** (Brief Pain Inventory). Celui-ci inclut des questions sur l'intensité de la douleur et son retentissement sur l'activité générale, le sommeil, les relations sociales, l'humeur, le goût de vivre, la marche, le travail habituel (Zelman et al., 2005).

8. Traitements

Actuellement, la prise en charge **médicamenteuse** pour prévenir la NP concerne uniquement l'**équilibre glycémique** qui joue un rôle primordial dans la survenue des complications. En effet, il a été démontré qu'une $HbA1c \leq 7\%$ diminue les risques de développer ou d'augmenter la sévérité des complications macro- et micro-angiopathiques qui sont des causes majeures de morbi-mortalité (Nathan et al., 2015). L'éducation du patient sur les **règles hygiéno-diététiques** est essentielle, en particulier la surveillance des pieds où des plaies peuvent rapidement dégénérer en ulcères. Ce sont les seules prises en charge qui existent contre la NP et ses symptômes.

Une prise en charge médicamenteuse de la **douleur neuropathique** n'est envisagée que si le patient se plaint de douleurs et ce traitement a fait l'objet de nombreuses recommandations (Bril et al., 2011). Le traitement consiste, dans un premier temps, à la prise d'**anti-inflammatoires non stéroïdiens** avec une attention particulière portée à leur néphrotoxicité. Les **antidépresseurs tricycliques** peuvent aussi être proposés ou des **antiépileptiques**.

A ce jour, la Gabapentine (anticonvulsivant) a démontré la meilleure efficacité pour diminuer les douleurs neuropathiques (Alam et al., 2020). L'application locale de **crèmes de capsaïcine** ou **lidocaïne** sur des zones de douleurs lancinantes ou de sensations de brûlures a démontré, en plus d'une réduction de la douleur, une diminution de la taille de la zone douloureuse (Gonçalves et al., 2020). Certaines pistes médicamenteuses se concentrent sur les agents mis en cause dans le développement de la NP.

Par exemple, des études ont utilisé des traitements à base d'antioxydants, inhibiteurs de l'aldose réductase ou acide γ -linoléique (Cameron et al., 2001; Albers and Pop-Busui, 2014). Deux études ont analysé l'effet d'une supplémentation en vitamine D et ont rapporté une diminution de l'inflammation et une amélioration de la microcirculation chez des sujets avec NP non douloureuse (Karonova et al., 2020) et une diminution des symptômes chez des sujets avec NP douloureuse (Basit et al., 2016).

Finalement, il existe des douleurs diverses et les médicaments montrent **des résultats peu satisfaisants** avec leur lot d'**effets secondaires** (Pop-Busui et al., 2017). L'efficacité de ces traitements symptomatiques repose sur le nombre de patients ayant une diminution de 30 à 50 % de leur douleur d'où une efficacité jugée modérée dans l'ensemble (Martinez et al., 2010). Finnerup et al. ont estimé à 30 % les patients qui ont eu une réduction de 30 % de leur douleur grâce à la médication (Finnerup et al., 2015). En ce sens, la prise en charge de la douleur neuropathique doit être multidisciplinaire. Elle peut faire appel à un traitement médicamenteux mais également à tout autre moyen efficace pour réduire la douleur comme l'électrostimulation ou les champs magnétiques (Lozeron et al., 2015; Mert, 2017).

Les traitements actuels sont exclusivement symptomatiques. Pourtant, l'importance des dysfonctions microcirculatoires dans le développement de la NP est reconnue. Dès lors, la compréhension de leurs mécanismes semble primordiale et place l'amélioration de la microcirculation au cœur de la prise en charge de la neuropathie.

*Chapitre II : Microcirculation cutanée et
diabète de type 2*

Partie 1. Microcirculation cutanée

1. Description

a. Généralités sur la microcirculation

La microcirculation comprend les vaisseaux sanguins de diamètre inférieur à 150 μm , c'est-à-dire les **artérioles**, les **capillaires** et les **veinules** (Jonhson, 2008). Leur rôle est de réguler les échanges et la perfusion des tissus.

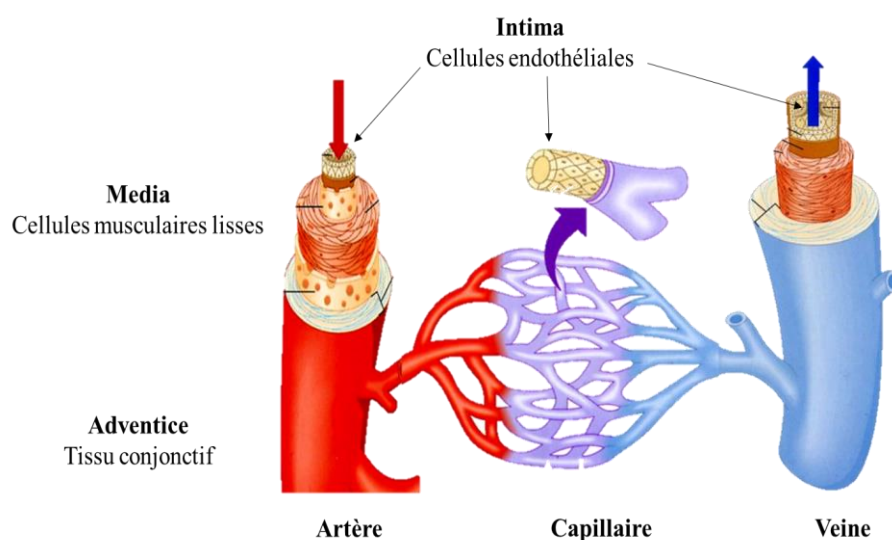


Figure 11 : Structure des microvaisseaux (Marieb et al., 2005)

La **structure** des vaisseaux se compose de 3 couches (Figure 11) :

- l'**adventice** : couche externe composée de tissu conjonctif contenant de l'élastine et du collagène,
- la **média** : couche intermédiaire comprenant des cellules musculaires lisses (CML),
- l'**intima** : couche interne des vaisseaux qui se compose des cellules endothéliales.

L'épaisseur de la paroi est liée au nombre de couches de CML et la présence des différentes couches dépend du type de vaisseaux.

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

L'adventice des **artérioles** (\varnothing 17-26 μm) a une innervation sympathique et parasympathique importante leur permettant de répondre rapidement au changement de pression sanguine et de protéger les capillaires. Grâce à leur capacité d'adaptation (relaxation ou constriction), elles sont le siège de la régulation du flux sanguin.

Au niveau des **capillaires**, on ne retrouve pas de couche intermédiaire, ni d'innervation. Ils ne sont pas capables de se contracter même si, dans certaines régions comme le cerveau et la rétine, on retrouve des péricytes (Figure 12) qui entourent leur paroi et qui jouent un rôle dans la régulation du flux sanguin et l'angiogenèse. Le diamètre des capillaires est proche de celui des globules rouges ($\sim 7 \mu\text{m}$) voire inférieur. Leur paroi est très fine ne comportant généralement qu'une seule couche de cellules endothéliales pour favoriser les échanges entre le sang et les tissus.

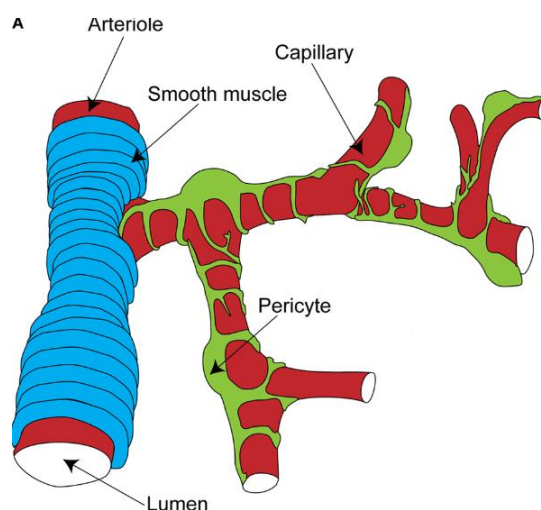


Figure 12 : Représentation de péricytes (Hamilton et al., 2010)

Les **veinules** post-capillaires sont plus nombreuses que les artérioles et ont un diamètre plus grand (12 à 35 μm). Elles sont faiblement innervées et contiennent des fibres de collagène leur permettant de se dilater pour évacuer une grande quantité de sang et diminuer la pression capillaire.

b. Au niveau de la peau

La microcirculation cutanée joue un rôle majeur dans la thermorégulation (Braverman, 2000). Cette capacité à réguler la température est liée à la dilatation des vaisseaux en condition de chaleur et à leur constriction en condition de froid.

Ainsi, on discerne deux couches distinctes dans la peau : l'**épiderme** et le **derme**. L'hypoderme faisant partie du tissu sous-cutané assure une réserve d'énergie grâce aux nombreuses cellules adipeuses qu'il contient (Figure 13).

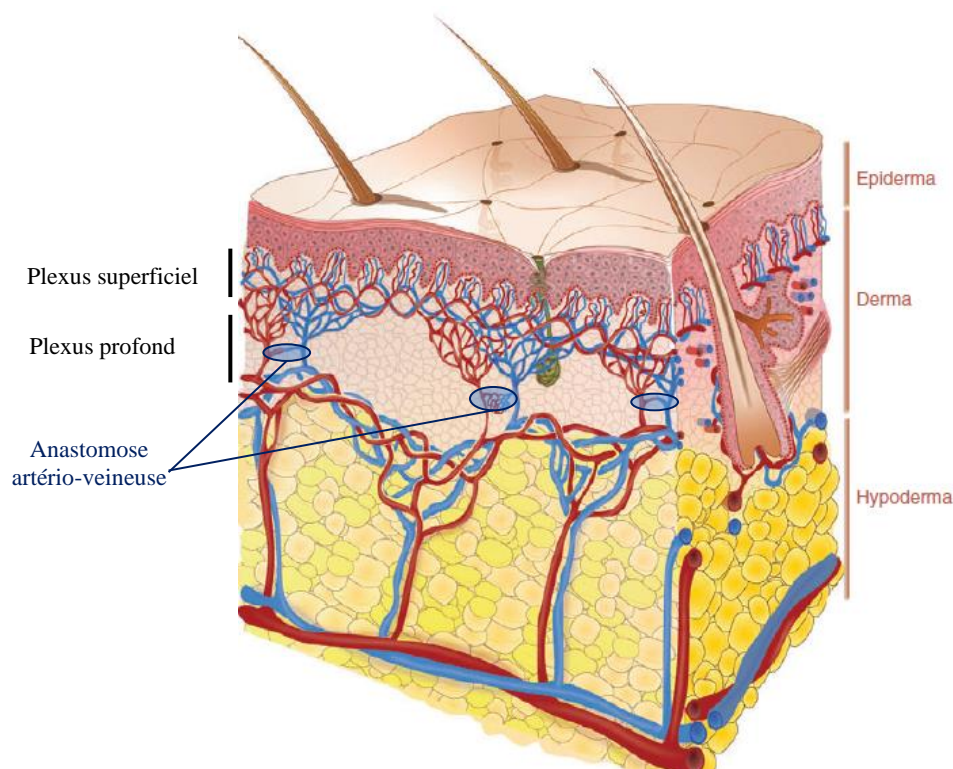


Figure 13 : Structure de la peau (Cracowski and Roustit, 2020)

L'**épiderme** a un rôle de protection et se compose de 5 couches différentes (stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum basale) contenant plusieurs types de cellules (kératinocytes, mélanocytes, macrophagocytes épidermiques, cellules de Merkel). Il n'est pas vascularisé.

Le **derme** se compose de nombreuses cellules : fibroblastes, fibrocytes, macrophagocytes, mastocytes et globules blancs mais aussi de fibres de collagène et d'élastine. Il comprend des nerfs, des vaisseaux sanguins, un réseau lymphatique, des follicules pileux et des glandes sudoripares.

Ces deux couches ont des épaisseurs différentes selon le type de peau. En effet, elles sont plus fines (épiderme ~ 0,1 mm ; derme ~ 1,5 mm) au niveau de la **peau non-glabre** (poilue) qui représente 90 % de la surface du corps humain. Cette peau est très impliquée dans la sensibilité tactile plurimodale avec la présence de divers récepteurs.

En revanche, la **peau glabre** plus épaisse (épiderme ~ 1,5 mm ; derme ~ 3 mm) est retrouvée principalement au niveau de la paume des mains, de la plante des pieds et dans les régions périunguéales des doigts et contient des récepteurs plus spécialisés et discriminants (Gould, 2018). Leur vascularisation est aussi différente et sera discutée dans les paragraphes suivants.

Le derme se subdivise en deux couches :

- la **zone papillaire** contenant des fibres de collagène et d'élastine, des terminaisons nerveuses et le passage d'un réseau dense de vaisseaux sanguins : le ***plexus superficiel*** (Figure 13). Ce plexus contient les **artérioles terminales**, les **boucles capillaires** et les **veinules** composant la circulation nutritive. Les boucles capillaires sont localisées à la jonction du derme et de l'épiderme pour la proximité avec la surface de la peau (Braverman, 2000). La grande surface occupée par les boucles capillaires permet les échanges thermiques essentiels à la thermorégulation (Johnson et al., 2014).
- la **zone réticulaire** est plus profonde et représente 80 % du derme, elle contient du collagène donnant de l'élasticité et de la résistance à la peau. Elle contient le ***plexus vasculaire profond***, situé à la jonction du derme et de l'hypoderme qui se compose de vaisseaux perforants faisant la connexion avec le plexus superficiel. Entre ces deux plexus, se trouvent les **anastomoses artério-veineuses** (AVAs) qui permettent de shunter le passage du sang dans les boucles capillaires (Figure 13). Les AVAs peuvent être de forme directe ou glomérulaire.

Les **AVAs** ne sont pas réparties de manière homogène au niveau de la peau. Elles sont principalement présentes au niveau de la peau glabre où on en dénombre 600 / cm² au niveau du rebord périunguéal et 100 / cm² sur les régions thénar et hypothénar de la main (Walløe, 2015). A une température ambiante neutre ou inférieure, les AVAs sont fermées et adressent le sang dans les capillaires. Dans un environnement chaud, les AVAs s'ouvrent pour shunter une partie du sang et dissiper la chaleur dans les tissus environnants (Cracowski and Roustit, 2020). Elles sont innervées par des fibres adrénergiques qui permettent de les ouvrir ou les fermer continuellement afin de réguler la circulation et la température locale.

2. Vasomotricité

La capacité d'adaptation des vaisseaux sanguins, et plus précisément des artérioles, à réduire (vasoconstriction) ou augmenter (vasodilatation) leur diamètre est appelée la vasomotricité. Elle permet de réguler le débit sanguin au niveau local et repose sur plusieurs mécanismes : nerveux, myogéniques et métaboliques qui engendrent une contraction ou une relaxation des CML de la paroi vasculaire. Les CML sont l'unité principale de régulation du tonus vasculaire, elles ont une capacité contractile et peuvent communiquer entre elles via des jonctions communicantes (jonctions gap) pour propager la contraction ou la relaxation aux CML environnantes. Quel que soit le facteur déclencheur, une diminution du Ca^{2+} intracellulaire provoque une hyperpolarisation de la membrane et donc une relaxation de la CML. Inversement, une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire provoque une dépolarisation et la contraction de la CML (Loirand et al., 1997).

a. Facteurs nerveux

L'innervation des microvaisseaux cutanés est principalement sympathique mais on observe aussi la présence de nerfs sensitifs à proximité de la paroi vasculaire.

Au niveau de la peau glabre, les **fibres adrénergiques vasoconstrictrices** sont majoritaires. Le relargage de neurotransmetteurs comme la noradrénaline provoque la contraction des CML via leurs récepteurs membranaires $\alpha 1$ et 2. Il a d'ailleurs été démontré que le tonus basal est vasoconstricteur car un blocage nerveux au bretylium provoque une augmentation du flux sanguin cutané au repos (Hodges et al., 2017a).

On retrouve aussi ces fibres au niveau de la peau non-glabre avec, en plus, la présence de **fibres sympathiques cholinergiques** induisant une **vasodilatation**. Cette vasodilatation active a été démontrée par une diminution de la réponse microcirculatoire à une exposition à la chaleur après blocage nerveux à la lidocaïne. Cette vasodilatation active est contrôlée à 80 % par le relargage d'acétylcholine (ACh) (Shibasaki et al., 2002). L'ACh se fixe sur les récepteurs muscariniques des cellules endothéliales et stimule la synthèse du NO. Sur la peau non-glabre, la vasodilatation nerveuse peut aussi être supportée par des fibres C nociceptives sensibles à la chaleur. L'entrée de Ca^{2+} via les canaux TRPV1 provoque le relargage de substance P et CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) (Danigo et al., 2013). Ces neuropeptides se fixent sur les mastocytes produisant de l'histamine. Cette réaction déclenche une dilatation artériolaire massive responsable du « flare » défini par Lewis en 1927, qui correspond à la zone de rougeur entourant une région lésée ou chauffée (Lewis, 1927).

b. Facteurs métaboliques

L'endothélium occupe une position stratégique entre le sang et les tissus. Il module l'activité des CML en relarguant des substances vasoactives par les jonctions gap et maintient ainsi l'équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction (Félétou et al., 2003).

La **vasoconstriction endothélium-dépendante** résulte de la libération de substances comme l'ET-1 dans des situations d'inflammation ou d'hypoxie. Elle se fixe sur les récepteurs ET_A et ET_B des CML et engendre une contraction de la CML (Figure 14). L'ET-1 peut aussi augmenter l'action d'autres substances vasoconstrictrices comme l'angiotensine-II qui a pour effet d'inhiber la NOS (Nitric Oxyde Synthase) réduisant la production de NO. L'hyperglycémie dans le diabète augmente la production de EOR, entre autres par la voie des polyols, la formation des AGE et altère la fonction endothéliale en diminuant la biodisponibilité du NO et en augmentant d'autres facteurs vasoconstricteurs comme le thromboxane A2.

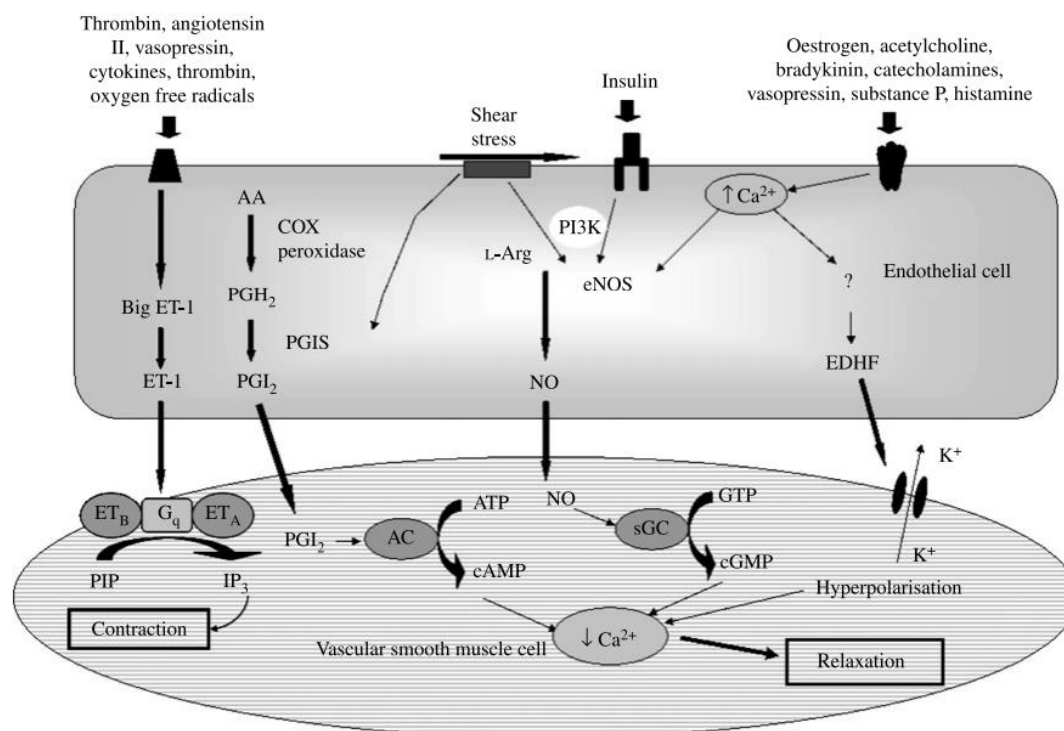


Figure 14 : Principaux mécanismes de contrôles endothélium-dépendant de contraction et relaxation des CML (Hall, 2009)

AA, arachidonic acid; COX, cyclo-oxygenase; ET-1, endothelin-1; PGI₂, prostacyclin; PGH₂, prostaglandin H₂; PGIS, prostacyclin synthase; ET_A, endothelin receptor A; ET_B, endothelin receptor B; G_q, G_q protein; PIP-IP₃, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-inositol 1,4,5-trisphosphate pathway; L-Arg, L-arginine; NO, nitric oxide; eNOS, endothelial NO synthase; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; AC, adenylyl cyclase; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; Ca²⁺, calcium; sGC, soluble guanylate cyclase; GTP, guanosine triphosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; EDHF, endothelium-derived hyperpolarising factor; K⁺, potassium.

Les voies de vasorelaxation médiées par l'endothélium sont activées par des stimuli mécaniques (pression artérielle, forces de cisaillement) et humoraux (hormones, substances libérées par le muscle squelettique, ATP, substance P, ACh...) (Vanhoutte, 2003). La **vasorelaxation médiée par l'endothélium** est majoritairement due au NO qui induit une relaxation des CML par augmentation du cGMP (guanosine monophosphate cyclique).

La synthèse du NO dans les cellules endothéliales se fait via la NOS à partir de la L-arginine (Figure 14). D'autres facteurs ont un effet vasodilatateur cumulatif à celui du NO comme l'EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) qui provoque l'ouverture des canaux K^+ (potassiques) des CML (Figure 14). La prostacycline dérivée des cyclooxygénases (COX) formée à partir de l'acide arachidonique a aussi un effet vasodilatateur. La contribution de ces différents facteurs à la relaxation endothélium-dépendante varie en fonction du calibre des vaisseaux sanguins. L'activité de l'EDHF est importante dans les vaisseaux de résistance (Fitzgerald et al., 2007). Au niveau des artères de gros calibre, les trois types de médiateurs contribuent à la relaxation musculaire lisse, mais la voie du NO apparaît comme primordiale chez les sujets sains (Félétou and Vanhoutte, 2006).

L'**insuline** a une action vasodilatatrice, en se fixant à ses récepteurs endothéliaux, elle active la voie PI3-K/ Akt et augmente la production de NO (Zeng et al., 2000). Cependant, elle peut aussi avoir une action vasoconstrictrice en stimulant la production d'ET-1 (Kim et al., 2006). En condition physiologique, l'insuline provoque une vasodilatation et le recrutement de capillaires au niveau de la peau et des muscles (Serne et al., 2002). Cette redistribution du flux sanguin des vaisseaux non-nutritifs aux vaisseaux nutritifs permet le stockage du glucose dans les tissus périphériques. Il a été démontré que l'effet vasodilatateur de l'insuline dépendait de l'activité myogénique (Rossi et al., 2005). Chez les sujets obèses et DT2, il a été montré que l'insuline perdait cet effet vasodilatateur (de Jongh et al., 2008; Rossi et al., 2004) et que cette diminution était la conséquence d'une diminution de l'activité myogénique chez des adolescents obèses (Montero et al., 2014). Cette altération de la réponse vasculaire à l'insuline pourrait être une caractéristique de l'insulino-résistance.

c. Autorégulation myogénique

Les CML, en plus de répondre aux sollicitations des nerfs et des cellules endothéliales, ont la capacité de contrer l'étirement excessif de leur paroi : c'est l'effet Bayliss (Bayliss, 1902). Il permet de maintenir le flux sanguin stable et de protéger les capillaires d'un grand changement de pression. Ce **tonus** est peu impliqué au repos mais est très efficace lors d'un changement de pression soudain, comme cela a été démontré lors d'une manœuvre de Valsalva (Durand et al., 2004).

3. Méthode d'exploration de la microcirculation cutanée

a. Outils de mesure

Les différences anatomiques des territoires cutanés et les différents mécanismes de régulation de la microcirculation rendent l'analyse et l'étude des microvaisseaux complexes (Stirban, 2014). Cependant, le développement et l'amélioration des techniques d'exploration permettent aujourd'hui d'étudier précisément la microcirculation en modulant les caractéristiques des outils de mesure.

On peut ainsi envisager d'étudier la microcirculation avec des outils très variés tels que :

- la **capillaroscopie** permet d'analyser la morphologie et le flux sanguin au niveau des vaisseaux nutritifs, via un microscope grossissant de 20 à 200 fois. L'avantage de cette technique est la possibilité de visualiser les érythrocytes, les capillaires et d'enregistrer leur recrutement lors d'une stimulation. Cependant, la mesure s'effectue sur des zones restreintes comme la région périunguéal où la peau est très fine et où les capillaires y sont organisés parallèlement à la surface de la peau. Cette technique permet principalement l'étude des conséquences des modifications du flux sanguin superficiel sur la morphologie microvasculaire.
- l'**OCT** (Optical Coherence Tomography) utilise le principe d'interférométrie, de la même manière que l'échographie, avec à la place du son, l'utilisation de la lumière. Cette technique permet de faire des images morphologiques tridimensionnelles très précises avec une grande résolution spatiale à une profondeur d'1mm. Son utilisation première n'est pas la mesure de la microcirculation cutanée et des études doivent être menées pour examiner sa reproductibilité lors d'application de stimuli ou en condition pathologique.

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

- la **TcPO₂** (Oxymétrie Transcutanée) évalue de manière non invasive la pression partielle en O₂ au niveau des tissus cutanés. Elle est basée sur l'évaluation du transfert d'oxygène vers la peau au moyen d'une sonde chauffée pour induire une vasodilatation. La réponse reflète ainsi la capacité du sang à fournir de l'oxygène aux tissus sur un point donné. L'avantage de cette technique est qu'elle est simple à mettre en place et c'est un bon prédicteur de la guérison des ulcères (Yip, 2015). L'inconvénient est sa reproductibilité moyenne du fait de sa mesure en un seul point nécessitant parfois des tests à des endroits distincts.
- la **NIRS** (Near-infrared spectroscopy) utilise les principes de transmission et d'absorption lumineuse de l'hémoglobine pour mesurer les concentrations d'hémoglobine oxygénée et désoxygénée. Le rapport entre la désoxyhémoglobine sur l'oxyhémoglobine permet de déduire la saturation en oxygène du tissu étudié. L'avantage est sa bonne reproductibilité, les inconvénients sont que la mesure est faite au niveau du muscle et que la pénétration de la lumière est dépendante de la présence ou non de tissu adipeux sous-cutané (Turner et al., 2013).
- la **PPG** (photopléthysmographie) permet de mesurer les variations de volume sanguin au niveau périphérique grâce à une lumière infrarouge qui est plus ou moins absorbée en fonction du volume de sang dans la zone étudiée. Les avantages de cette technique sont sa simplicité d'utilisation, son faible coût et la possibilité de faire une analyse spectrale du signal (Mizeva et al., 2015).
- la **thermographie infrarouge** enregistre la température cutanée. Or les variations de température sont très fortement liées à la microcirculation cutanée et son rôle dans la thermorégulation. Cependant, la température et la microcirculation ne sont pas corrélées linéairement. A ce jour, les mesures thermiques ne peuvent pas remplacer une mesure plus directe du flux sanguin cutané.

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

- les **techniques de laser-doppler** reposent sur ce même principe où le tissu étudié est éclairé par une fibre optique qui émet une lumière laser alors qu'une autre reçoit la lumière rétrodiffusée. Certains photons de la lumière interagissent avec les cellules sanguines en mouvement dans les vaisseaux induisant un décalage entre lumière émise et lumière rétrodiffusée (l'Effet Doppler), base de calcul de la perfusion tissulaire. Ces techniques non invasives permettent d'explorer l'aspect fonctionnel de la microcirculation cutanée (Roustit and Cracowski, 2012).
 - Le **LDF**, avec une longueur d'onde de 780 nm, pénètre à environ 1-1,5mm de profondeur dans la peau. Malgré une faible résolution spatiale (1 mm³), sa haute résolution temporelle permet de faire une analyse spectrale du signal et d'analyser les mécanismes régulant les oscillations du flux sanguin : le flowmotion.
 - Ces techniques basées sur la rétrodiffusion de la lumière et l'effet Doppler ont été étendues à des systèmes d'imagerie comme le **LDI** qui se compose d'une caméra et scanne une région pour retransmettre une image 2D en temps réel. Elle permet de mesurer le flux sanguin superficiel.
- La circulation superficielle peut aussi être mesurée par le **LSCI (laser speckle contrast Imaging)** qui utilise aussi une caméra. Le principe est ici basé sur des changements dynamiques produisant une interférence de contraste qui change avec les variations du flux sanguin au fil du temps. Le signal de sortie donne une image à code couleur : bleu- faible perfusion jusqu'au rouge- perfusion élevée. L'avantage de cette technique est sa grande résolution spatiale mais à une faible profondeur de pénétration : environ 300 µm (O'Doherty et al., 2009).

Ces deux dernières techniques seront présentées plus en détail dans la partie matériel et méthodes.

Impact des conditions de mesure

Les conditions de mesure ont une grande importance sur les mesures microcirculatoires (Mahé et al., 2012a). En effet, pour les techniques en contact avec la peau comme le LDF, l'hétérogénéité spatiale des vaisseaux sanguins peut faire varier les résultats. Quelle que soit la technique, il est primordial de tenir compte des facteurs environnementaux qui peuvent jouer sur les réponses microcirculatoires et impacter les conclusions des études. Il a été démontré que les mouvements d'air pouvaient interférer avec le signal du LSCI (Mahé et al., 2012b) et que la

luminosité devait rester stable tout au long des enregistrements. La température ambiante doit être constante (autour de 22°C) car elle peut engendrer des modifications de température corporelle et cutanée.

La température cutanée doit elle aussi être bien contrôlée, Abraham et al. ont montré que les réponses à des tests vasodilatateurs étaient différents en fonction du niveau de température cutanée. Cependant, l'expression par rapport aux valeurs basales permettrait de limiter ces différences (Abraham et al., 2013). Les variations de flux sanguin diurnes ont été étudiées et il semblerait que le respect d'une période d'acclimatation à l'environnement de la salle de mesure est plus important et permet de s'affranchir des variations diurnes (Houben et al., 1994).

Finalement, avec l'avancée en âge, il a été noté des changements anatomiques avec moins de boucles capillaires chez les personnes âgées mais cela n'influçait pas le CBF mesuré par LDF (Li et al., 2006). Hodges et al. avaient comparé des mesures LDF et LSCI au repos, après PORH et exercice chez des garçons et des jeunes adultes sans démontrer de différence entre les deux tranches d'âge (Hodges et al., 2019a). Le sexe semblerait avoir un impact à l'adolescence et dépendrait très fortement du cycle menstruel (Cankar et al., 2016; Schlager et al., 2014).

Le protocole des études de cette thèse est décrit en détail dans la partie « matériels et méthodes » et l'évolution des températures de la pièce, corporelle et cutanée, a été prise en compte. Les mesures ont été faites dans la même salle avec une température et luminosité stable et tous les enregistrements ont été effectués après une période d'acclimatation suffisamment longue pour ne pas perturber les mesures.

b. Flowmotion

Le flowmotion est le reflet direct de la vasomotion qui correspond aux fluctuations spontanées du diamètre artériel entraînant des oscillations du flux sanguin. Ces oscillations semblent contribuer de façon significative à la perfusion tissulaire (Stefanovska et al., 1999) et des modifications du flowmotion sont généralement associées à une altération de la fonction microvasculaire et des problèmes de redistribution du sang et d'oxygénation des tissus (Clough et al., 2017). Ainsi, un flowmotion élevé permettra d'augmenter l'oxygénation tissulaire (Schmidt et al., 1993). Les fréquences de ces fluctuations rythmiques du flux ont été montrées sous la dépendance du rythme cardiaque, de la fréquence respiratoire et de mécanismes locaux myogéniques, neurogéniques et endothéliaux (Bracic and Stefanovska, 1998; Kvernmo et al., 1999) :

- **Bande I : 0.0095–0.02 Hz représente la fonction endothéliale**

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

- **Bande II : 0.02–0.06 Hz représente l'activité neurogénique**
- **Bande III : 0.06–0.15 Hz représente l'activité myogénique**
- **Bande IV : 0.15–0.4 Hz représente la respiration**
- **Bande V : 0.4–1.6 Hz représente le rythme cardiaque**

Bracic et Stefanovska ont facilement démontré dans leur article que les **hautes fréquences** (bandes IV et V) représentaient les **mécanismes régulateurs centraux** que sont la **respiration** et le **rythme cardiaque**. Ils ont comparé le spectre microcirculatoire avec celui du rythme respiratoire et de l'électrocardiogramme pour montrer une corrélation avec les bandes IV et V, sachant que les pompes cardiaques et respiratoires sont des régulateurs de la pression sanguine (Bracic and Stefanovska, 1998). Cependant, Häfner et al. ont montré que la respiration et la fréquence cardiaque contribuaient à moins de 2,5 % du flowmotion (Häfner et al., 2007).

Les **basses fréquences** (bandes I, II et III) représentent les **mécanismes de contrôle locaux** :

- **métabolique** par réaction des cellules endothéliales à la présence de substances vasoactives dans le sang.

Kvernmo et al. ont montré que l'infusion de substances vasodilatatrices endothéliales dépendantes (ACh) ou endothéliales indépendantes (Sodium Nitroprusside - SNP) par iontophorèse augmentait la puissance spectrale dans les bandes I et III du signal (Kvernmo et al., 1999). En effet, l'ACh induit une vasodilatation endothéliale par production de NO, de PG et d'EDHF qui peuvent aussi jouer un rôle relaxant sur les CML. Le SNP provoque, quant à lui, un relâchement direct des CML par augmentation du cGMP. L'augmentation supérieure dans la bande I après infusion d'ACh par rapport au SNP a démontré qu'elle était principalement influencée par des facteurs endothéliaux. Kvandal et al. (2003) et Stewart et al. (2007) ont confirmé que la bande I était modulée par l'endothélium en cherchant quelle substance était la plus impliquée entre le NO, les PG et l'EDHF. Pour cela, ils ont injecté des inhibiteurs de NO (L-NAME, L-NG-Nitro Arginine Methyl Ester) et des PG (Aspirine – Inhibitrice des COX) et ont observé que l'aspirine n'influaient pas sur la vasodilatation induite par ACh alors que la L-NAME la diminuait. Par conséquent, la bande I est majoritairement régulée par le NO et non par les PG (Kvandal et al., 2003; Stewart et al. 2007).

Enfin, Kvandal et al. ont complété le découpage de l'analyse spectrale avec la description d'une sixième bande comprise entre 0.005 - 0.0095 Hz. Cette bande est augmentée en présence d'ACh, elle est donc endothéliale dépendante mais des blocages du NO et des PG n'ont pas modifié son augmentation après iontophorèse d'ACh. Cette bande Ib semblerait donc être influencée par l'EDHF (Kvandal et al., 2006).

- **neurogénique** par innervation sympathique des artérioles

L'implication d'une innervation sympathique locale dans le contrôle des oscillations microcirculatoires a été démontrée par Söderström et al. (2003) en comparant le spectre du signal sur une zone ayant subi une greffe de peau récente, avant réinnervation et sur de la peau saine.

Ils ont ainsi montré une réduction du signal dans les bandes de fréquence I et II sur la zone greffée. D'après Kvernmo et al., la bande I représente l'activité endothéliale et lors de la greffe, une seule artère et une seule veine sont reconnectées, expliquant la moindre activité endothéliale. La diminution dans la bande II, quant à elle, peut s'expliquer par l'absence d'innervation dans la zone greffée (Söderström et al., 2003). Chez le sujet sain, Hodges et al. ont démontré une diminution de cette bande au repos après microdialyse de brétylium (bloqueur sympathique) montrant qu'elle est influencée par l'activité sympathique (Hodges et al., 2017a).

En plus des fibres sympathiques, il se pourrait que les fibres sensibles contribuent à la régulation de cette bande mais pour le moment aucune étude n'a testé leur implication au repos.

- **myogénique** par action des CML

Il a été démontré que cette bande est associée au contrôle du flux sanguin par les CML de la paroi des vaisseaux sanguins qui réagissent continuellement aux changements de pression (Johnson, 1991). Dans l'étude de Söderström et al., les oscillations de la bande III sont conservées sur le lambeau de peau greffée démontrant que l'activité de cette bande est médiée par l'autorégulation myogénique des vaisseaux qui ne sont pas encore ré-innervés (Söderström et al., 2003). Dans une population ayant subi une dénervation, Krupatkin et al. ont eux aussi démontré une diminution de la bande neurogénique avec conservation de la bande III suggérant que les CML peuvent contribuer de manière autonome à la vasomotion (Krupatkin, 2006, 2009).

Le flowmotion est un moyen très intéressant d'analyser des mécanismes de contrôle de la microcirculation. Cette méthode totalement non-invasive, contrairement aux approches pharmacologiques nécessitant l'injection ou la microdialyse de substances chimiques, permet d'observer facilement les changements au repos ou après l'application d'un stress. Cependant, il reste assez peu utilisé et il n'existe pas de consensus sur la façon de traiter les données (gestion des artefacts, lissage du signal,...), ni de recommandations sur les durées d'enregistrement qui doivent être suffisamment longues pour une analyse spectrale fiable (Martini and Bagno, 2018). Pour autant, il est parfois difficile d'imposer un temps d'enregistrement long à certaines populations mais aussi selon les protocoles (enchaînement de stimuli).

En ce sens, notre première étude s'est intéressée à déterminer le temps d'enregistrement LDF minimal permettant de conserver une analyse spectrale de qualité au repos chez des sujets sains.

Partie 2. Dysfonctions microcirculatoires au repos chez les diabétiques

1. Altérations des perfusions cutanées et hypothèses

Le développement de la NP étant associé à des troubles microcirculatoires, de nombreux auteurs ont étudié la microcirculation cutanée afin de détecter des altérations précoces chez les sujets diabétiques. Les mesures sont souvent effectuées au niveau de l'avant-bras mais chez le sujet diabétique, les études sur le pied sont à privilégier cette région étant la première touchée par la NP et/ou les ulcères. Le caractère glabre ou non de la peau est important à préciser dans les comparaisons entre études au regard de leur anatomie vasculaire différente.

Au niveau de la **peau non-glabre** (face dorsale du pied), le flux sanguin cutané (CBF), mesuré par LDF au repos, est souvent rapporté comme étant non différent entre patients diabétiques et contrôles (Colberg et al., 2003; Mizeva et al., 2017). Dans une étude intéressante couplant LDF et TcPO₂, Iwase et al. ont confirmé l'absence de différence de CBF de patients DT2 et des sujets contrôles mais ont rapporté une TcPO₂ inférieure dans le groupe DT2. Ces résultats laissent supposer une hypoperfusion au niveau des boucles capillaires en charge des échanges avec la peau (Iwase et al., 2007). La **présence de NP** n'altère pas le CBF comparé à des DT2 sans NP et une population contrôle (Nabuurs-Franssen and Schaper N., 2002; Park et al., 2016). Cependant, Nabuurs-Fransen et Schaper ont constaté une diminution de la vitesse du flux capillaire mesurée par capillaroscopie chez les NP par rapport à des DT2 sans NP, confirmant l'hypothèse d'une hypoperfusion au niveau superficiel exagérée en présence de NP. La présence de NP associée à d'autres complications telles que la vasculopathie et l'arthropathie de Charcot n'a pas démontré d'altération supplémentaire du CBF comparé aux DT2 sans complication et à des sujets témoins (Veves et al., 1998). Seules deux études ont noté un CBF supérieur chez les DT2 avec NP. Cette divergence de résultats peut s'expliquer par la présence d'un groupe contrôle plus jeune (Jan et al., 2019) et la présence de NAC et d'ulcères au niveau du pied dans le groupe NP (Belcaro and Nicolaidis, 1991). L'hétérogénéité de la population diabétique et les divers outils diagnostic de la NP rendent l'analyse et la comparaison des résultats d'études complexes.

Au niveau de la **peau glabre** du pied (face plantaire du pied), les résultats sont plus controversés avec soit un CBF supérieur chez les sujets DT2 avec NP comparé à des sujets contrôles (Jan et al., 2013, 2019; Rayman et al., 1986), soit aucune différence (Cacciatori et al., 1997; Stoyneva et al., 2017).

Cette divergence de résultats pourrait s'expliquer par l'inclusion de patients DT2 avec des stades de NP avancés dans les deux premières études ou plus précoces dans les deux dernières. Ceci pourrait suggérer que les dysfonctions microcirculatoires au repos deviennent significatives à des stades avancés de la NP.

L'explication de l'absence de différence ou d'augmentation du CBF non-nutritif évalué par LDF repose sur deux hypothèses : l'**hypothèse hémodynamique** et le « **capillary steal** ». Aujourd'hui, le fait que l'un puisse être l'origine de l'autre ou que leur contribution soit conjointe dans le développement des troubles microvasculaires est encore débattu (Chao and Cheing, 2009).

- L'**hypothèse hémodynamique** est introduite en 1983 par Parving et al (1983). Elle est basée sur le fait que l'hyperglycémie stimule de nombreuses voies métaboliques (entre autres la voie des polyols) qui limitent la production de NO. Progressivement, l'endothélium est lésé et perd ses capacités adaptatives provoquant une augmentation du CBF et de la pression intracapillaire (Parving et al., 1983). Avec le temps, des remodelages structurels comme l'épaississement des parois diminuent les échanges entre les capillaires et les tissus. La sclérose artériolaire réduit le diamètre des vaisseaux et concourt à la perte des capacités vasomotrices. L'hyperglycémie étant à l'origine de la survenue de ces troubles, un bon contrôle glycémique réduit le risque de développer des troubles microcirculatoires (Nathan et al., 2015).
- L'hypothèse du **vol capillaire**, en anglais « **capillary steal** », s'explique par une mauvaise redistribution du flux sanguin entre le plexus superficiel (boucles capillaires) et le plexus profond (au niveau des AVAs). Chez les diabétiques, la perte du tonus vasculaire provoque une ouverture des AVAs qui réorientent le sang dans les veinules sans passer dans les boucles papillaires (Figure 15) (Sharma et al., 2020). Dans les stades les plus avancés, la NP provoque une dénervation des AVAs qui restent donc constamment ouvertes et perdent leur capacité à réguler la distribution du sang entre les deux plexus. Il y aurait un shunt total du sang via les AVAs et donc, une ischémie capillaire expliquant la difficulté chez les NP à cicatriser les plaies cutanées.

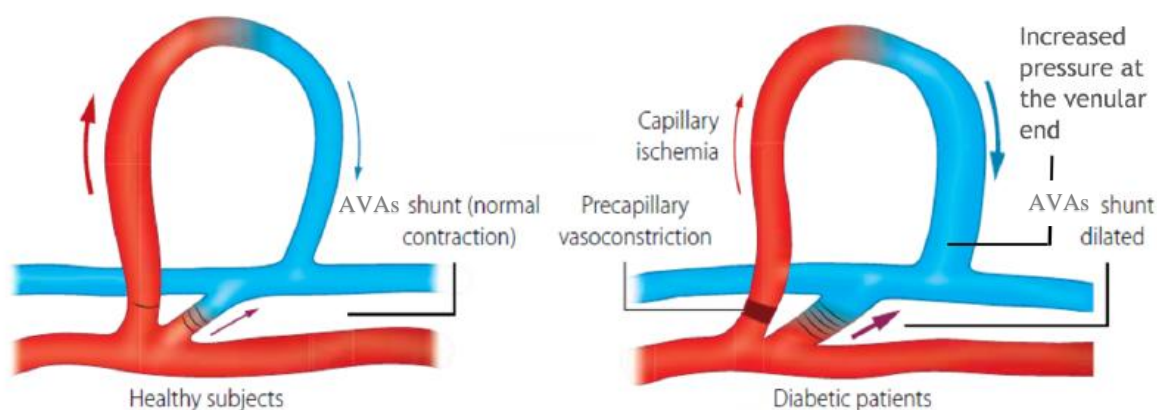


Figure 15 : Représentation du "capillary steal" avec augmentation du flux dans les AVAs (Sharma et al., 2020)

Pour mettre en avant ces deux hypothèses, l'étude du CBF au niveau des capillaires nutritifs est incontournable. Ceci est réalisable par capillaroscopie ou par LSCI et quelques études ont démontré une diminution du CBF dans les capillaires par capillaroscopie chez des DT2 avec ou sans NP par rapport à des sujets sains (Jörneskog et al., 1995; Nabuurs-Franssen and Schaper N., 2002). Ces résultats confirment l'hypothèse du vol capillaire qui peut être remarqué avant l'apparition de NP. A notre connaissance, aucune étude à ce jour n'a utilisé le LSCI (mesurant le CBF superficiel) pour comparer la microcirculation capillaire au repos des sujets DT2 avec ou sans NP et des sujets sains.

Au-delà de la seule étude des perfusions, des changements de flowmotion et des mécanismes sous-jacents locaux (endothéliaux, myogéniques et neurogéniques) pourraient être des indicateurs précoces de dysfonction microcirculatoire chez les DT2.

2. Flowmotion : mécanismes explicatifs

A ce jour, le flowmotion chez les DT2 a seulement été étudié sur des signaux LDF (réseau non-nutritif). Comme pour le CBF, les composantes de flowmotion sont différentes selon le type de peau. En effet, Jan et al. ont démontré que le CBF sur la face plantaire du pied était supérieur au CBF mesuré au niveau dorsal. Leur analyse spectrale démontre une contribution relative supérieure de la composante endothéliale et inférieure des composantes myogénique et respiratoire sur la face plantaire. En revanche, les composantes neurogénique et respiratoire n'étaient pas différentes selon les sites (Jan et al., 2019).

L'**amplitude totale du spectre** a été démontrée comme diminuée chez des sujets DT2 avec NP ou NAC par rapport à des sujets contrôles et des DT2 sans NP (Lefrandt et al., 2003; Sun et al., 2012; Urbancic-Rovan et al., 2004). Ce spectre total a été démontré comme associé à l'âge et la pression artérielle et inversement associé au tour de taille dans un sous-groupe de la cohorte de Maastricht (Muris et al., 2013). Chez des DT2 sans complications, aucune étude n'a démontré une diminution de la puissance spectrale totale. Ce n'est qu'en cas de NP que le spectre est diminué, expliquant la mauvaise régulation du CBF (Jan et al., 2019; Rayman et al., 1986). Cette diminution est aussi liée à des changements sur les mécanismes contrôlant le flowmotion.

En effet, il a été démontré que le contrôle **endothélial** était diminué chez les DT2 sans NP par rapport à des sujets sains (Hu et al., 2017; Mizeva et al., 2017) et chez les DT2 avec NP comparé à des DT2 sans NP (Sun et al., 2012, 2013). Cette diminution peut s'expliquer par la durée du diabète (Muris et al., 2013) et l'installation progressive de la microangiopathie et de la dysfonction endothéliale (Loader et al., 2019) concourant au développement de la NP.

Le contrôle **neurogénique** est logiquement plus faible chez les DT2 atteints de NP (Sun et al., 2012, 2013) par l'altération au niveau central du tonus sympathique et au niveau local par la perte des fibres sensitives (Hu et al., 2017). Hu et al. et Mizeva et al. ont également rapporté une diminution de la composante neurogénique chez les sujets DT2 mais la présence de NP n'avait pas été diagnostiquée (Hu et al., 2017; Mizeva et al., 2017).

Le contrôle **myogénique** n'a pas été démontré comme différent entre les DT2 avec ou sans NP et les sujets sains (Sun et al., 2012, 2013). Cependant, en valeur normalisée sur le spectre total, il semble que la composante myogénique soit augmentée chez les sujets NP par rapport aux autres. Ceci reflèterait un phénomène compensatoire à la diminution des mécanismes endothéliaux et neurogéniques. Dans l'étude de Hu et al., les sujets DT2 ont une diminution du contrôle myogénique par rapport aux sujets sains mais, contrairement aux études précédentes, les mesures de flux sanguin ont été réalisées en position assise impliquant une réponse veino-artériolaire à l'afflux sanguin au niveau des pieds (Hu et al., 2017).

Les deux **composantes centrales (cardiaque et respiratoire)** ont été moins étudiées que les composantes locales. La composante respiratoire n'a pas montré de différences chez les sujets DT2 par rapport à des sujets sains mais les résultats de la composante cardiaque sont contradictoires (Hu et al., 2017; Mizeva et al., 2017).

L'analyse du flowmotion démontre des changements dans les mécanismes de régulation du CBF en présence de NP sans que ces atteintes n'affectent forcément le niveau basal de CBF.

Partie 3. Dysfonctions microcirculatoires en réponse à différents stress

L'exploration de la réactivité microcirculatoire à des stimuli vasoconstricteurs ou vasodilatateurs pourrait exacerber les altérations présentes au repos ou en mettre d'autres en évidence.

Afin de se rapprocher au maximum du contexte clinique des patients, l'utilisation de stimuli physiques plus écologiques est un outil intéressant. Parmi les stimuli physiques, seuls seront présentés et discutés ceux utilisés dans les études de cette thèse.

L'**hyperhémie thermique** locale induite par une sonde thermique permet d'atteindre une vasodilatation maximale. L'**exercice**, en tant que stress hémodynamique, induit dans une moindre mesure une vasodilatation périphérique. Il est peu utilisé pour stimuler la microcirculation mais l'activité physique fait partie intégrante de la prise en charge thérapeutique des patients DT2. Il peut apporter des informations sur la capacité de réponse des vaisseaux et constituer la base d'un programme de réadaptation. Les changements de posture comme le passage couché à debout ou la simple **mise en position déclive** du pied induit une vasoconstriction et reflète des contraintes quotidiennes.

Ces différents stimuli, complétés par une analyse du flowmotion, pourrait permettre d'expliquer des dysfonctionnements des mécanismes de contrôle du flux sanguin chez les patients diabétiques avec ou sans NP.

1. Hyperhémie thermique locale

a. Mécanismes chez le sujet sain

En réponse à l'application de chaleur sur la peau, les vaisseaux cutanés se dilatent : c'est l'hyperhémie thermique locale (LTH). Le protocole consiste à chauffer la surface de la peau sous le seuil de douleur thermique entre 42 et 44 °C (Minson et al., 2001). Cette méthode est très reproductible par LDF et par LSCI (Agarwal et al., 2010; Roustit et al., 2010a, 2010b) et est largement utilisée pour étudier la fonction vasculaire. En effet, les mécanismes de contrôle du LTH sont bien décrits et permettent d'observer les dysfonctions microvasculaires nerveuses et endothéliales de manière non-invasive (Fuchs et al., 2017).

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

Concernant le protocole, il convient de faire chauffer, de manière rapide, une sonde thermique car un chauffage lent ne provoque qu'une augmentation progressive du CBF jusqu'au plateau de vasodilatation maximum et non la réponse biphasique contenant le pic initial et le plateau (Del Pozzi et al., 2016). Le **pic initial** s'observe au début de l'application de chaleur dans les 2-3 premières minutes (Minson et al., 2001) (Figure 16) et représente le réflexe axonal (Brunt and Minson, 2011; Pergola et al., 1993). La chaleur est détectée par des récepteurs sensibles à la chaleur comme TRPV1 qui se trouve sur les fibres C. Leur activation déclenche la libération de neurotransmetteurs : CGRP et substance P qui active l'adénylate cyclase et l'AMPC-kinase (adénosine monophosphate) et l'ouverture des canaux potassiques provoquant l'hyperpolarisation de la membrane des CML (Johnson et al., 2014). Ce pic est largement diminué après blocage du système nerveux sympathique (EMLA ou brétylium) ou chez des sujets ayant subi une sympathectomie (Charkoudian et al., 2002; Hodges et al., 2017a).

Après 30 minutes de chauffage, la vasodilatation prolongée atteint **un plateau** (deuxième phase de la réponse hyperémique) qui est lié à 70 % à la production de NO par les cellules endothéliales (Figure 16) et à 30 % à l'EDHF dont les EETs (acides époxyeicosatriénoïques) (Brunt and Minson, 2011; Minson et al., 2001; Roustit and Cracowski, 2013). Différents récepteurs sont stimulés (CGRP-R, TRPV1, récepteurs adénosine) et vont, via l'AMPC et L-arginine, activer la NOS. Le NO produit provoque la fermeture des canaux calciques et donc la vasorelaxation des CML. Il a été démontré que la eNOS (endothélial NOS) est plus impliquée dans la réponse à l'hyperhémie thermique locale alors que la nNOS (neural NOS) serait impliquée lors d'une hyperthermie corps entier (Kellogg et al., 2009).

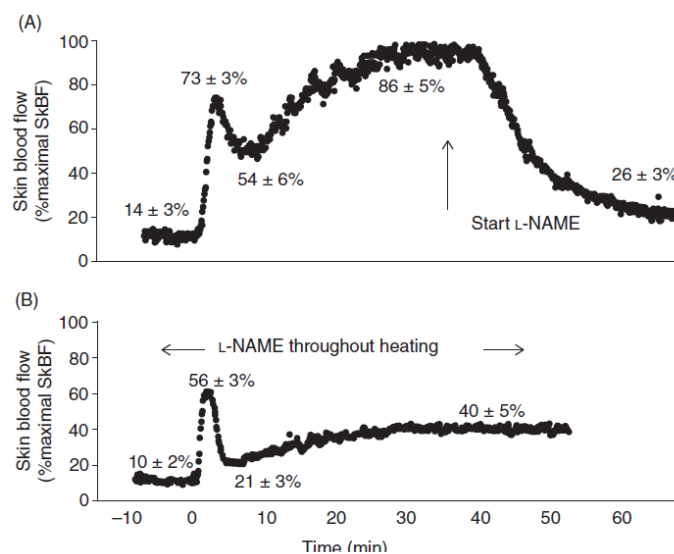


Figure 16 : Représentation de signaux LDF pendant une hyperhémie thermique locale chez des sujets sains avec infusion de L-NAME pendant le plateau (A) ou dès le début du LTH (B) (Minson et al., 2001)

Les mécanismes de contrôle du LTH ont été démontrés grâce à des techniques pharmacologiques ou invasives par microdialyse (Dreyfuss et al., 2013; Minson et al., 2001) mais quelques auteurs ont utilisé le **flowmotion** pour étudier ces mécanismes de manière totalement non-invasive (Bagno and Martini, 2015).

Pendant le LTH, le spectre total ainsi que toutes les composantes locales (endothéliale, neurogénique et myogénique) sont augmentées (Bagno and Martini, 2016; Hodges and Del Pozzi, 2014). La réponse au LTH est différente entre les membres inférieurs et supérieurs. Le pic axonal est supérieur au niveau de la jambe par rapport à l'avant-bras alors que le plateau est supérieur au niveau de l'avant-bras (Balaz et al., 2015). De même, il a été démontré que le plateau de vasodilatation est plus important au niveau de l'avant-bras que de la jambe avec une implication supérieure des composantes endothéliale et neurogénique (Hodges and Del Pozzi, 2014). Pour aller plus loin, Hodges et al. ont comparé les réponses de perfusions et de flowmotion au LTH après blocage au brétylium. Ils ont noté une diminution importante de la composante neurogénique, au repos, pendant le pic axonal et le plateau au niveau de la jambe et du bras démontrant l'implication du système sympathique pendant la réponse hyperémique.

Le blocage au brétylium a aussi provoqué une légère augmentation de la composante endothéliale au repos, n'a pas eu d'impact sur cette bande pendant le pic axonal et a provoqué une diminution pendant le plateau au niveau du bras seulement.

Sur la bande myogénique, aucun effet n'a été retrouvé au niveau de l'avant-bras et au repos mais a provoqué une diminution de sa contribution pendant le pic et le plateau au niveau de la jambe. Enfin, aucun effet n'a été retrouvé sur les composantes cardiaque et respiratoire, illustrant l'implication de phénomènes locaux essentiellement. Cette étude démontre l'implication de la bande neurogénique principalement pendant la phase pic initiale et la possibilité d'appréhender ces mécanismes par le flowmotion (Hodges et al., 2017a). Il faut noter que le site de mesure est important dans la comparaison des études puisque les mécanismes ne sont pas impliqués de la même manière.

b. Dysfonctions chez le patient diabétique

Une méta-analyse datant de 2017, dans laquelle 857 patients ont été inclus sur la base de 13 études, a démontré une diminution de la réponse au LTH chez les sujets diabétiques sans influence du type de diabète ou de sa durée révélant l'impact du diabète seul sur la dysfonction microvasculaire (Fuchs et al., 2017).

Il a été rapporté une réduction d'environ 20-25 % de l'augmentation des perfusions en réponse au LTH chez des sujets DT2 sans NP (Figure 17) mais que le blocage du NO par L-NAME réduisait la réponse hyperémique de la même manière chez ces sujets et des sujets contrôles (Sokolnicki et al., 2007). La diminution de réponse au LTH est exacerbée en présence de NP indépendamment du site de mesure (avant-bras ou face dorsale du pied) (Arora et al., 1998; Park et al., 2016; Veves et al., 1998).

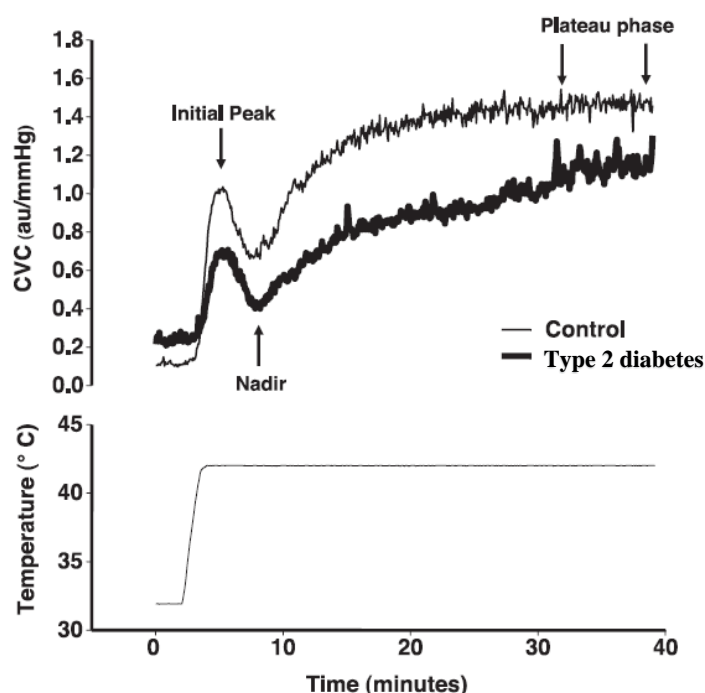


Figure 17 : Réponse réduite à une hyperhémie thermique locale chez des sujets DT2 par rapport à des sujets sains exprimée en CVC (Sokolnicki et al., 2007)

Dans l'étude de Storm et al., il n'a pas été mis en évidence de différence sur le pic axonal entre des DT2 sans NP avec un bon contrôle glycémique et des sujets sains mais la diminution du CBF, lors du pic initial, peut être liée à la perte des fibres sensibles très marquées en cas de NP (Jan et al., 2013). La perte progressive de fibres nerveuses cutanées et donc la diminution du nombre de récepteurs TRPV1 impliqués dans la réponse axonale pourraient expliquer la baisse de réponse retrouvée chez les DT2 avec NP.

Malgré la connaissance des mécanismes qui régissent la réponse au LTH et l'accessibilité de l'analyse spectrale, le nombre d'études sur le **flowmotion** en réponse à l'hyperhémie thermique locale chez les DT2 avec ou sans NP reste limité (Tableau 5).

Tableau 5 : Bilan de la littérature sur le flowmotion pendant LTH chez des patients diabétiques avec ou sans neuropathie

Auteurs	Sujets	Outils/ Site de mesure	Stimulation/ Protocole	Résultats PU	Résultats flowmotion
Schmiedel et al., 2007 <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i>	- 10 CT - 17 DT2 (MAU) avec microalbuminurie - 12 DT2 sans NP	LDF – FFT Avant-bras	- LTH 44°C	- Repos : CBF ns - Maximal LTH 44° : MAU < DT < CT	LTH : ENDO / MYO / NEURO MAU < DT2 < CT
Jan et al., 2013 <i>Microvascular Research</i>	- 8 CT - 18 DT2 NP	LDF - WT Tête du premier métatarse (≈glabre)	- LTH 42°C - 10 min repos - 30 min à 42° - 10 min post-LTH	- Repos : CBF NP > CT - Pic initial : NP < CT - Nadir : NP < CT - Plateau : NP < CT	Pic initial : (normalized) Endo/Neuro/Myo NP < CT Plateau : (normalized) Endo/Neuro/Myo NP < CT
Liao et al., 2017 <i>Clinical Hemorheology and Microcirculation</i>	- 8 CT - 18 DT2 NP	LDF – WT Tête du premier métatarse (≈glabre)	- LTH 42°C - 10 min repos - 30 min à 42° - 10 min post-LTH	- Repos : CBF NP > CT - Pic initial : NP < CT - Nadir : NP < CT - Plateau : NP < CT	Repos : Neuro NP < CT Pic initial : (relative) Neuro NP < CT Respi/Cardio NP > CT Plateau : (relative) Endo NP < CT Respi/Cardio NP > CT
Mizeva et al., 2017 <i>Microvascular Research</i>	- 40 CT - 23 DT2	LDF - WT Entre le 1 ^{er} et le 2 ^{ème} métatarse	- LTH 35°C - 4 min - LTH 42°C - 10 min Analyse spectrale sur 50 bandes de fréquences	- Repos : CBF ns - LTH 42° : DT2 < CT	Repos : (normalized) Endo/Neuro/Cardio DT2 < CT LTH : (normalized) Myo/Respi/Cardio DT2 < CT

CT, sujets contrôles ; DT2, diabétiques de type 2 ; LDF, Laser Doppler Flowmeter ; FFT, Fast Fourier Transform ; LTH, Local Thermal Hyperemia ; CBF, cutaneous Blood Flow ; MAU, microalbuminurie ; NP, Neuropathie périphérique ; WT, Wavelet Transform ; Endo, bande endothéliale ; Neuro, bande neurogénique ; Myo, bande myogénique ; Respi, bande respiratoire ; Cardio, bande cardiaque ; FreqSTIM – FreqREST : Bande de fréquence stimulée - Bande de fréquence au repos ; <, inférieur à ; > supérieur à ; ns, non significatif.

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

Les auteurs ont démontré qu'en présence de complications comme une microalbuminurie, la vasodilatation maximale à 44 °C était diminuée sur l'avant-bras par rapport à des DT2 sans microalbuminurie et des sujets contrôles. Cette diminution est associée à des niveaux plus faibles sur les bandes endothéliale, neurogénique et myogénique (Schmiedel et al., 2007).

Dans les études chez les DT2 avec NP, on ne retrouve pas d'analyse sur l'évolution du spectre total, ni de comparaison avec le spectre total d'un groupe de sujets sains. Les études se sont concentrées sur l'analyse des mécanismes impliqués pendant la réponse hyperémique. Ainsi, Jan et al. ont démontré des niveaux plus faibles des composantes basses fréquences (endothéliale, neurogénique et myogénique) quelle que soit la phase de la réponse hyperémique (pic initial ou plateau) chez les DT2 avec NP par rapport à des sujets sains (Jan et al., 2013). Plus tard, Liao et Jan ont traité leurs données spectrales de manière différente. Le ratio de chaque bande pendant le LTH par rapport au repos a été calculé et a permis de démontrer une diminution de la bande neurogénique pendant la phase du pic initial et de la bande endothéliale pendant la phase plateau par rapport aux sujets sains. Ces diminutions étaient compensées par l'augmentation des bandes respiratoires et cardiaques dans chacune des phases (Liao and Jan, 2017). Mizeva et al. ont quant à eux démontré des niveaux dans les bandes myogénique, respiratoire et cardiaque diminués chez des DT2 sans NP pendant le LTH. Cependant, leur protocole est très différent des autres études avec un pallier à 35 °C pendant 4 minutes puis une augmentation à 42 °C n'induisant pas de pic axonal mais une augmentation progressive des perfusions et certainement, des mécanismes impliqués différemment (Mizeva et al., 2017).

2. Récupération post-exercice

a. Mécanismes chez le sujet sain

L'exercice aigu, même à un niveau modéré, provoque une réponse du système cardiovasculaire aux demandes en oxygène des muscles actifs. Une redistribution des débits sanguins s'opère avec une vasoconstriction sympathique dans les territoires inactifs et une vasodilatation dans les régions actives avec une augmentation du débit sanguin et du shear stress.

Au niveau de la microcirculation cutanée, on retrouve d'une part, une vasoconstriction pour répondre à la demande métabolique des tissus et muscles en action et d'autre part, une vasodilatation active pour évacuer la chaleur (Green et al., 2017; Johnson et al., 2014). Il semblerait que ces mécanismes ne soient pas en conflit mais plutôt dans la continuité l'un de l'autre.

- En début d'exercice, le **réflexe vasoconstricteur** se met très rapidement en place. Cette vasoconstriction est fonction du niveau basal de CBF. En effet, il a été démontré que l'augmentation de la température cutanée entraînait une vasoconstriction plus importante dans les 5 premières minutes d'exercice (Taylor et al., 1984). Elle est dépendante d'un système adrénergique vasoconstricteur intact (Kellogg et al., 1991).
- Dans la continuité de l'exercice, la **vasodilatation active thermorégulatrice** se met à son tour en place lorsqu'un certain seuil de température interne est atteint (Demachi et al., 2013). De manière logique, l'augmentation de température interne est étroitement liée à l'intensité et la durée de l'exercice. Il a été rapporté que le changement d'osmolarité du plasma au cours de l'exercice jouait un rôle sur le **seuil de température interne** déclenchant la vasodilatation (Mitono et al., 2005). En revanche, la température cutanée ne semble pas jouer un rôle primordial sur le passage d'un phénomène à l'autre (Demachi et al., 2013). Une fois le seuil de température dépassé, la vasodilatation augmente linéairement jusqu'à atteindre un plateau (Green et al., 2017; Wissler, 2008).

Lorsque l'exercice s'arrête, les besoins métaboliques des muscles chutent et le CBF augmente pour éliminer la chaleur accumulée jusqu'à revenir à l'état de repos (Potočnik and Lenasi, 2016). Les mécanismes centraux très impliqués pendant l'exercice (baroréflexe, métaboréflexe et mechanoréflexe musculaires) se retirent progressivement pour retrouver un état de repos (Journeay et al., 2004). Il a largement été démontré, chez les sujets sains jeunes ou âgées, une augmentation de la microcirculation cutanée pendant l'effort et maintenue après l'exercice (Hodges et al., 2019a; Journeay et al., 2004; Potočnik and Lenasi, 2016). L'intensité et la durée d'exercice jouent sur le niveau d'augmentation de la microcirculation et son retour à la normale pendant la récupération.

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

Cependant, il a été démontré que même un test de marche de 6 minutes sous-maximal suffisait pour engendrer une augmentation des débits sanguins cutanés mesurés par LDF (Miâdi-Messaoud et al., 2012).

De manière intéressante, il convient de différencier les deux types de peau (glabre et non glabre) qui réagissent à l'inverse pendant et après l'exercice (Figure 18). En effet, les deux types de peau sont sous l'influence du système vasoconstricteur sympathique qui joue majoritairement son rôle au niveau des sphincters précapillaires et des AVAs largement représentées sur **la peau glabre**. Le système sympathique vasodilatateur, quant à lui, n'est présent que sur la **peau non-glabre** (Lenasi, 2014; Yamazaki and Sone, 2006). Comme clairement démontrée par Potocnik et al. (Figure 18) et Yamazaki et Stone (2006), la peau glabre a un niveau de perfusion plus élevé au repos que la peau non-glabre. Lors d'un exercice progressif sur cycloergomètre, le flux sanguin mesuré sur la pulpe du doigt diminue immédiatement tout en restant supérieur à la peau non glabre. Au contraire sur la peau non glabre, l'exercice en dessous de 60 % de VO_{2max} (consommation maximale d'oxygène) n'a pas d'effet mais à des intensités plus élevées, les perfusions augmentent significativement (Lenasi, 2014). Les niveaux de perfusion des deux types de peau sont alors semblables pour des intensités d'exercice très élevées (Figure 18). Lors de la récupération, les deux types de peau retournent vers leur valeur de base avec une augmentation du flux sanguin sur la peau glabre et une diminution sur la peau non-glabre (Potočnik and Lenasi, 2016). Ces retours à la normale sont rapides pendant la phase précoce de 5 à 10 minutes post-exercice puis il y a une stabilisation pendant la phase de récupération plus tardive (Figure 18).

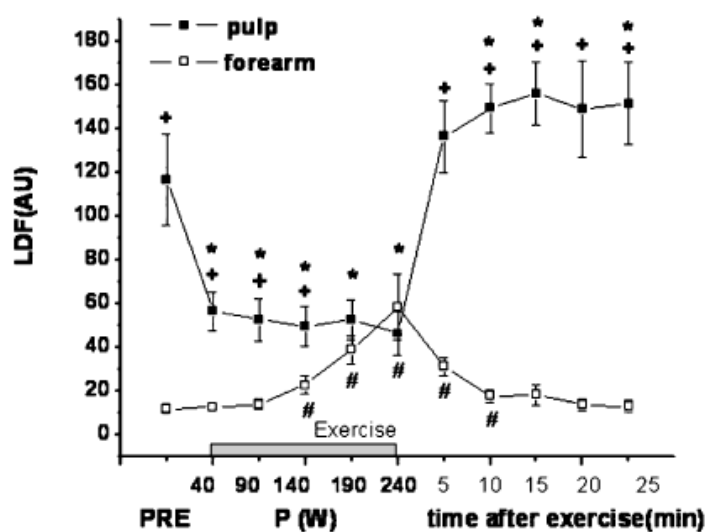


Figure 18 : Réponse microcirculatoire mesurée par LDF sur la pulpe du doigt (symboles noirs) et au niveau de l'avant-bras (symboles blancs) pendant l'exercice et la récupération (Potocnik et al., 2016)

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

Sur la **peau non-glabre**, les mécanismes de thermorégulation sont impliqués dans l'augmentation du CBF et sont liés à l'augmentation des forces hémodynamiques et l'effet du shear stress contre les parois vasculaires qui stimule la synthèse de NO. Pendant la récupération, le CBF reste augmenté avant de revenir au niveau basal et donc l'activité NO-dépendante via le shear stress reste aussi augmentée par rapport au repos.

Au niveau de **la peau glabre**, le flux diminue à l'exercice par augmentation de l'activité sympathique et la fermeture des AVAs tandis qu'à la récupération, elles s'ouvrent pour laisser passer un maximum de sang vers la peau et participer à la thermorégulation en évacuant la chaleur résiduelle (Potočnik and Lenasi, 2016).

Très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes impliqués pendant la récupération grâce à l'analyse du **flowmotion** des signaux LDF. Seuls Kvernmo et al. et plus récemment, Rossi et al. l'ont étudiée chez des soldats entraînés (Kvernmo et al., 1998), et chez des sujets sédentaires et des sujets entraînés (Rossi et al., 2006). Le spectre total en cohérence avec le niveau de perfusion était augmenté après l'exercice reflétant une augmentation globale de vasomotion. Les bandes cardiaques et respiratoires, liées à l'activation au niveau central du tonus sympathique, étaient augmentées mais leurs contributions relatives sur le spectre total n'ont pas été modifiées par l'exercice. La bande myogénique, que ce soit en valeur absolue ou en contribution relative, était augmentée reflétant l'autorégulation myogénique en réponse à un changement de pression. Enfin, Rossi et al. ont démontré une augmentation des contributions relatives des composantes locales neurogénique et endothéliale alors que Kvernmo et al. n'ont pas montré d'évolution de ces composantes après l'exercice. Ces différences pourraient s'expliquer par :

- le type d'exercice utilisé (cycloergomètre maximal vs sur tapis roulant à 80 % de VO_{2max} , respectivement),
- la durée d'exercice (7 à 10 minutes vs 40 minutes, respectivement) qui engendrerait des niveaux de shear stress et de vasodilatation sympathique pour évacuer la chaleur moins importants dans l'étude de Kvernmo et al.,
- le délai d'enregistrement après l'exercice plus tardif dans l'étude de Kvernmo et al. (15 minutes après la fin de l'exercice vs dès l'arrêt de l'exercice) pouvant refléter un retour à la baseline des composantes locales.

Il est important de noter que le calcul des contributions relatives n'a pas été effectué de la même manière entre les deux études et peut expliquer partiellement les différences de résultats.

Pour finir, le LDF reflète le flux sanguin au niveau des AVAs et est majoritairement utilisé dans les études mais le fait que la sonde soit fixée sur la peau nécessite que le site de mesure ne soit pas en mouvement pendant l'enregistrement. Ainsi, Hodges et al. ont couplé des mesures LDF et LSCI au niveau de l'avant-bras pendant un exercice sur vélo et ont démontré des valeurs de perfusions LSCI (plexus superficiel) supérieures à celles du LDF (plus profond) (Hodges et al., 2019a). Sur ce même type d'exercice, Mahé et al. ont démontré qu'un post-processing sur les données LSCI permettait de limiter les artefacts dans le signal (Mahe et al., 2013). Dès lors, le LSCI peut être utilisé pour étudier les réponses pendant l'exercice dans divers types de populations.

b. Dysfonctions chez le patient diabétique

Les études sur l'effet microcirculaire d'un exercice aigu chez le diabétique sont rares. A notre connaissance, seuls Colberg et al. ont exploré la microcirculation cutanée après l'exercice chez les sujets diabétiques (Colberg et al., 2003). Le but de cette étude était d'étudier l'effet d'un exercice préalable sur les réponses microcirculaires au repos et en réponse au LTH. Suite à un exercice incrémental maximum sur vélo, le CBF sur le dessus du pied était augmenté à 10 minutes post-exercice chez les seuls sujets diabétiques entraînés et aucun changement significatif n'a été retrouvé chez les sujets sains sédentaires et entraînés, ni chez les diabétiques sédentaires. En revanche, la réponse au LTH était altérée dans les deux groupes de DT2 avant exercice et le restait après l'exercice chez les seuls DT2 sédentaires démontrant l'importance de l'entraînement et de l'activité physique pour améliorer les fonctions microvasculaires.

En effet, l'activité physique régulière est une stratégie bénéfique chez le sujet diabétique avec une amélioration du contrôle glycémique, une diminution des complications et du risque cardiovasculaire (Snowling and Hopkins, 2006). Or, malgré les recommandations de l'ADA sur l'activité physique et l'exercice dans la prise en charge du diabète (Colberg et al., 2016), il est connu que le niveau d'activité physique habituelle est diminué chez le DT2 (Tudor-Locke et al., 2002) et qu'il existe une intolérance à l'effort avec une diminution de la VO_{2pic} chez les DT2 par rapport à des sédentaires sains (Vukomanovic et al., 2019). La fonction endothéliale, la sensibilité à l'insuline et la densité capillaire sont améliorées et ce, même pour des exercices de faible à moyenne intensité (Colberg et al., 2006; Lee et al., 2018). Dans le cadre de la NP, l'exercice physique aérobie sur le long-terme retarde l'arrivée et/ou la progression de la NP en améliorant la conduction nerveuse, certainement grâce à la répétition d'épisode d'hyperémie (Atkinson et al., 2018), l'amélioration de la fonction endothéliale et la stimulation du flux sanguin endoneural (Balducci et al., 2006).

Chapitre II : Microcirculation cutanée et diabète de type 2

L'absence d'étude sur l'analyse du flowmotion après un exercice chez des sujets DT2 avec ou sans NP pourrait mettre en évidence des altérations de la réponse microcirculatoire à l'exercice et les mécanismes impliqués.

Ce constat est à l'origine de la deuxième étude de cette thèse qui a exploré les changements des perfusions cutanées et de flowmotion pendant la récupération post-exercice chez des sujets DT2 avec ou sans NP.

3. Déclivité

a. Description

L'augmentation de la pression veineuse dans les membres lors d'un changement de posture (passage d'une position couchée à assise ou debout) engendre, chez le sujet sain, une diminution des débits sanguins cutanés au niveau du pied due au réflexe de **vasoconstriction artériolaire (VAR)** (Vissing et al., 1997). Ce VAR a pour objectif de protéger les capillaires en limitant l'augmentation de pression hydrostatique (Rayman et al., 1986) et ainsi diminuer le risque d'œdème.

Le degré de vasoconstriction est proportionnel à :

- la hauteur de la colonne sanguine entre le pied et le coeur. Ainsi, la mise en position debout provoque une élévation de pression plus importante que le simple fait de laisser pendre son pied dans le vide (Figure 19). Chez le sujet sain adulte (~ 53,4 ans), Belcaro et al. ont testé l'impact de différents changements de posture sur le VAR : le passage en position debout a provoqué une diminution de 48.5 % du CBF contre 36.8 % pour la position déclive du pied (Belcaro and Nicolaidis, 1991).
- la durée de maintien de la position. Vissing et al. ont mesuré une diminution de 63 % du CBF lors du passage en position debout chez des sujets jeunes (20-30 ans) après 6 minutes seulement. Après 50 minutes en position assise chez des sujets sains âgés (~58 ans), Nabuurs-Fransen et al (2002), ont noté une diminution de 26 % du CBF (Nabuurs-Franssen and Schaper N., 2002).

Par contre, l'âge ne semble pas impacter la réponse microcirculatoire au VAR induit par la mise en déclivité du pied (Snyder et al., 2012).

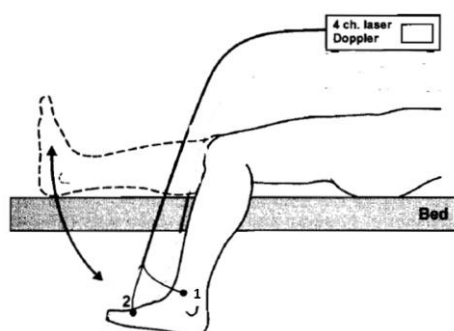


Figure 19 : Position déclive du pied (Khiabani et al., 2000)

b. Mécanismes chez le sujet sain

Les mécanismes de contrôle du VAR ne sont pas encore clairement établis.

Dès les années 70, sur la base de résultats chez 3 sujets, il a été suggéré que le VAR était sous contrôle **sympathique**, via l'activation des barorécepteurs veineux lorsque la pression transmurale veineuse s'élève au-delà de 25 mmHg (Henriksen and Sejrsen, 1976). Le message nerveux relaye l'information par les fibres sympathiques adrénérergiques au système nerveux central d'une part et d'autre part, il le transmet immédiatement aux fibres post-ganglionnaires innervant les artérioles provoquant une vasoconstriction et une fermeture des sphincters capillaires (Figure 20). Vissing et al. ont confirmé que le VAR n'était pas contrôlé au niveau central puisqu'un bloc axillaire n'impactait pas la diminution des perfusions lors du passage en position debout alors que l'application de lidocaïne (anesthésique local) abolissait totalement la réponse (Vissing et al., 1997). Le VAR était ainsi nommé le « réflexe local axonal ».

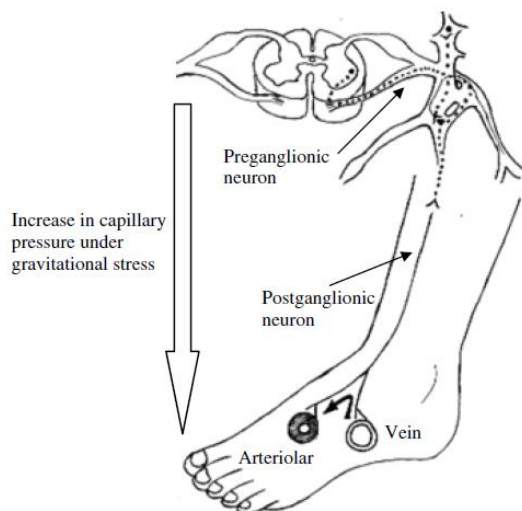


Figure 20 : Réflexe veino-artériolaire lors de la déclivité du pied (Chao et al., 2009)

Crandall et al. ont démontré qu'une anesthésie locale réduisait considérablement le VAR alors qu'un blocage des fibres α -adrénérergiques avait peu d'impact. Cette étude a laissé penser que le VAR pourrait dépendre d'autres facteurs nerveux comme le neuropeptide Y ou l'ATP ou alors que ce sont les **CML** qui jouent le plus grand rôle dans le VAR (Crandall et al., 2002; Snyder et al., 2012). En effet, la réponse **myogénique**, particulièrement importante au niveau des artérioles, s'autorégule en fonction des variations de pression sanguine pour protéger les capillaires. Okazaki et al., par comparaison des diminutions de perfusion en déclivité ou après congestion veineuse, ont estimé que le réflexe myogénique contrôle le VAR à plus de 50 % (Okazaki et al., 2005).

Plus récemment, Silva et al. ont fait une analyse spectrale d'un signal PPG au niveau plantaire de l'hallux pendant la déclivité du pied chez des sujets sains jeunes. Cette analyse a permis d'observer les mécanismes de contrôles locaux du VAR et d'identifier une diminution des bandes neurogénique, myogénique et NO-dépendante mais une augmentation de la bande NO-indépendante (Silva et al., 2018). Cette étude suggère une implication de **l'endothélium** dans le VAR, en cohérence avec une diminution du VAR en ambiance chaude (Davison et al., 2004).

Pourtant, Fujii et al. par des analyses pharmacologiques plus directes, ont démontré que l'inhibition de la NOS n'influe pas sur la réponse au VAR et que celle des COX non plus. Cela signifie que l'endothélium dépendant du NO n'est pas impliqué et que les agents vasoconstricteurs comme le thromboxane A₂ non plus. En revanche, il semble que les canaux potassiques calcium- (K_{Ca}) et voltage- (K_V) dépendant soient impliqués dans la réponse au VAR. Le blocage des canaux K_{Ca} empêche la repolarisation cellulaire et diminue l'amplitude de la réponse au VAR. Au contraire, le blocage des canaux K_V entraîne une dépolarisation rendant la cellule beaucoup plus excitable et augmente l'amplitude de la réponse au VAR (Fujii et al., 2020). Ces canaux, situés au niveau de la membrane des CML, démontrent la part importante du tonus **myogénique** dans la régulation du VAR sur une peau non-glabre.

Finalement, dans ces différentes études, le VAR n'est pas toujours induit de la même manière (congestion veineuse, mise en position debout ou déclivité du pied) et le site de mesure est parfois différent (peau glabre ou non). Ceci peut expliquer les désaccords sur les mécanismes de régulation VAR et la nécessité d'approfondir leur compréhension par d'autres études. L'observation des mécanismes sous-jacents du VAR par analyse spectrale peut facilement s'appliquer aux enregistrements LDF et ouvre de nouvelles perspectives d'études.

c. Dysfonctions chez le patient diabétique

Plusieurs auteurs ont rapporté une réduction du VAR mesurée par LDF au niveau du pied chez les patients diabétiques comparée à une population contrôle et cette diminution est exagérée en présence de NP (Belcaro and Nicolaidis, 1991; Cacciatori et al., 1997; Rayman et al., 1986).

L'altération de ce réflexe pourrait expliquer les complications oedémateuses caractéristiques du pied diabétique (Rayman et al., 1986). Au cours de l'évolution du diabète, les parois des vaisseaux sanguins sont plus rigides et moins en capacité à s'adapter, les CML sont aussi moins sensibles aux molécules circulantes. En cas de NP, la **perte axonale diminue encore la capacité vasoconstrictrice** sympathique et le shunt artérioveineux provoque une mauvaise redistribution du flux sanguin entre les AVAs et les capillaires.

Contrairement aux premières études consensuelles, les résultats des études plus récentes sont plus controversés (Tableau 6). Ainsi, Nabuurs-Fransen et al (2002) ont rapporté une diminution des perfusions en position assise chez tous leurs sujets et un retour à la normale au bout de 10 minutes pour les contrôles alors que le CBF restait diminué de 18 % chez les DT2 sans NP et de 26 % chez les DT2 avec NP. Pour les patients avec ulcères, cette diminution était de 38 % au bout de 10 minutes laissant donc penser à une vasoconstriction exagérée dans les groupes présentant des complications plus sévères (Nabuurs-Fransen and Schaper N., 2002). Cette vasoconstriction serait constante, limitant l'apport sanguin au niveau des plaies cutanées et la guérison des ulcères. Pour autant, les valeurs de perfusions cutanées au repos ne sont pas différentes entre ces groupes.

Iwase et al. ont noté une absence de modification de CBF lors du passage en position assise chez les patients DT2 avec ou sans NP comparativement à une diminution chez les sujets sains. Ce CBF non modifié était accompagné d'une augmentation de TcPO₂ témoignant d'une dissociation entre oxygénation et perfusion chez les DT2 (Iwase et al., 2007).

Park et al. n'ont pas mis en évidence de différence significative sur les diminutions de CBF après passage en position debout entre les groupes de DT2 avec ou sans NP et leur groupe contrôle, même si cette réduction semblait moindre chez les DT2 avec NP (p=0.06) (Park et al., 2016).

Enfin, Stoyneva et al. ont retrouvé une augmentation du CBF au niveau de la peau glabre chez les diabétiques après passage en position assise alors que les sujets sains démontraient une diminution de leur CBF (Stoyneva et al., 2017).

Ces résultats contradictoires pourraient être liés à :

- l'évolution temporelle de la prise en charge des DT2 et de la détection des complications (NP, NAC),
- l'analyse de groupes de DT2 incluant des sujets avec et/ou sans NP (Iwase et al., 2007),
- l'induction du VAR qui varie selon les études (position debout, assise ou déclivité du pied),
- le site de mesure.

Finalement, la question se pose de savoir quels mécanismes de contrôle du VAR sont altérés ou non chez les DT2 avec ou sans NP. Une analyse spectrale des signaux LDF au cours du VAR pourrait permettre de répondre à cette question.

En ce sens, la troisième étude de cette thèse a exploré via le flowmotion les mécanismes impliqués dans le VAR induit par la mise en déclivité du pied chez des sujets DT2 avec ou sans NP.

Tableau 6 : Bilan de la littérature sur l'évaluation du VAR chez des patients diabétiques avec ou sans neuropathie

Auteurs	Sujets	Outils / Site de mesure	Stimulation / Protocole	Résultats
Rayman et al., 1986 <i>British Medical Journal</i>	- 13 CT - 13 DT2 - 13 NP (VPT, BiothesioM)	- LDF - Face plantaire hallux	- Déclivité - PUrest : moyenne sur 2 minutes - PUVAR : moyenne entre 3e et 4e min du VAR	- Repos : CBF NP > CT - VAR : (% repos) NP = 53.5 % DT2 = 28.9 % CT = 18.1 % CBF NP > DT2/CT
Belcaro et al., 1989 <i>Angiology – The journal of vascular diseases</i>	- 30 CT - 30 NP+ (13 NAC+, 12 DFU, DT type ?)	- LDF - Partie dorsale pied	- Position debout - PUrest - PUVAR : Valeur minimale sur les 3 min VAR	- Repos : CBF NP > CT - VAR : CBF \searrow CT ; ns DT
Belcaro et al., 1991 <i>Angiology – The journal of vascular diseases</i>	- 40 NP (15 DFU/ 20 NAC) - 40 DT (type ?) - 30 CT	- LDF - Partie dorsale pied	*5 min déclive *5 min debout *5 min assis jambes tendues - VAR = (VARMIN- PUrest) / (PUrest/100) - Mesure du Time to VARMIN	- Repos : CBF NP > DT > CT - VARstanding : NP < DT < CT Respectivement -16.5% / -30.7% / -48.5% - Time to VARMIN : plus long chez NP > DT > CT VARstanding > VARdéclivité > VARassis
Belcaro et al., 1992 <i>Angiology – The journal of vascular diseases</i>	- 100 NP - 100 DT (type ?) - 100 CT	- LDF - Partie dorsale pied	Idem qu'étude 1991 mais uniquement position debout. - Comparer le VAR après 3ans d'évolution	- \searrow VAR que chez les NP
Cacciatori et al., 1997 <i>The American Journal of medicine</i>	- 22 CT - 22 DT2 - 15 NP (Test VPT) - 10 DFU	- LDF - Face plantaire hallux	- Déclivité - PUrest : moyenne sur 2 min - PUVAR : moyenne entre 3e et 4e min % VAR = [PUrest – (PUVAR- PUrest)]x100	- Repos : ns - % VAR \searrow DFU (-8.6 %) < NP (-33.3 %) < DT (-58.8 %) < CT (-72.8 %)

Auteurs	Sujets	Outils / Site de mesure	Stimulation / Protocole	Résultats
Nabuurs-Fransen et al., 2002 <i>Diabetologia</i>	- 16 CT - 14 DT2 - 24 NP (Valk Score)	- LDF - Partie dorsale pied	- Repos allongé - Position assise pendant 50 minutes + capillaroscopie	- Repos : ns - Pic : NP > DT > CT - Time to Pic : DT < NP et CT - % réduction CBF à 10 min : NP > DT > CT (-28 % / -18 % / -3 %)
Iwase et al., 2007 <i>Exp Clin Endocrinol Diabetes</i>	- 13 CT - 40 DT2 (NP+/-, NAC+/-)	- LDF - TcPO2 - Partie dorsale pied	Position assise	- Repos : LDF ns TcPO2 DT < CT - VAR LDF CT (-30 %) ; DT (0 %) TcPO2 CT (+18 %) ; DT (+46 %)
Park et al., 2016 <i>Microcirculation</i>	- 16 CT - 20 DT2 - 20 NP (basé sur plusieurs tests)	- LDF - Partie dorsale pied	- Position debout - PUrest : moyenne sur 1 min - PUVAR : moyenne sur 1 min après 2min debout	- Repos : ns - %VAR : tendance p=0.06 NP (-35.7 %) vs DT (-46.9 %) CT (-7.8 %)
Stoyneva et al., 2017 <i>Clinical Hemorheology and Microcirculation</i>	- 24 CT - 50 NP (ENMG)	- LDF - Face plantaire hallux	- Repos allongé - Position assise 10 min	- Repos : ns - Assis : Diminution perfusion CT -35.8 PU > DT +10.7 PU

CT, sujets contrôles ; DT2, diabétiques de type 2 ; NP, Neuropathie périphérique ; VPT, vibration perception Threshold ; NAC, neuropathie autonome cardiaque ; AOMI, artériopathie oblitérante des membres inférieurs ; LDF, Laser Doppler Flowmeter ; PU_{rest}, perfusion de repos ; PU_{VAR}, perfusion pendant le VAR ; CBF, cutaneous Blood Flow ; VAR, veno-arteriolar reflex, DFU, diabetic foot ulcer ; DT, diabétiques ; VAR_{MIN}, valeur de perfusion minimale pendant le VAR ; TcPO2, pression en O₂ transcutanée ; ENMG, electroneuromyographie ; <, inférieur à ; > supérieur à ; ns, non significatif ; ↘, diminution.

*Chapitre III : Les champs magnétiques
basses fréquences*

1. Généralités

L'étude de l'effet des **champs magnétiques**, statiques ou variables, sur la santé humaine couvre un large champ d'application portant autant sur leurs effets néfastes que bénéfiques. La littérature porte ainsi sur une large variété de sujets comme par exemple, les limites d'exposition des travailleurs aux champs magnétiques ou le développement d'appareils de traitement des troubles musculo-squelettiques.

Il est d'usage de distinguer deux types de champs magnétiques :

- le champ magnétique qui existe indépendamment de tout champ électrique. Il est alors qualifié de **statique** ou indépendant du temps. Ce type de champ magnétique est créé par des aimants permanents ou par des courants électriques permanents.
- le champ magnétique qui résulte de courants électriques non permanents, de champs électriques variables, ou du déplacement d'aimants permanents. Il est alors qualifié de **variable**, apportant une complexité supplémentaire car la variabilité du champ magnétique est la source d'un champ électrique qui ne peut être considéré de façon indépendante générant de fait un **champ électromagnétique (EMF)**.

Depuis quelques années, il semble que les champs magnétiques statiques ont peu d'effets physiologiques alors que les champs magnétiques pulsés ou sinusoïdaux sont plus efficaces et pour des intensités bien plus faibles. Ce sont donc essentiellement ces champs magnétiques variables et par extension électromagnétiques, que nous étudions dans ce chapitre.

Principes de fonctionnement

L'électricité se caractérise par un mouvement d'électrons qui génère un champ électrique et un champ magnétique. Ces champs varient dans le temps et se propagent dans l'espace pour transporter une énergie. Ils sont caractérisés par plusieurs propriétés physiques : Puissance [Watts], Fréquence [Hertz], Longueur d'onde [Mètre], Intensité [Volt/mètre] pour le champ électrique et Ampère/mètre [Tesla] pour le champ magnétique. Ces effets d'un champ électromagnétique sont explicités dans l'équation de la **force de Lorentz** :

$$\vec{F} = q\vec{E} + q\vec{v} \wedge \vec{B}$$

Les vecteurs \vec{E} et \vec{B} étant respectivement le champ électrique et le champ magnétique pris au point où se trouve la particule portant une charge électrique q , et \vec{v} représente la vitesse de cette particule.

Chapitre III : Les champs magnétiques basses fréquences

Les éléments de cette équation décrivent la force \vec{F} générée par un champ électrique et/ou magnétique et souligne l'importance de ses effets sur une particule chargée en mouvement qui devient sensible aux champs magnétiques du fait de sa vitesse.

La fréquence de variation d'un EMF joue alors un rôle prépondérant dans les effets physiopathologiques sur les tissus et il est d'usage de séparer les fréquences en 2 groupes (Figure 21) :

- les **EMF ionisants** comprenant les hautes fréquences que sont les ultraviolets et les rayons X. Ils sont considérés comme dangereux pour la santé car ils sont capables de séparer un électron de son atome.
- les **EMF non-ionisants** avec des fréquences plus faibles qui interagissent avec la matière provoquant divers effets biophysiques.

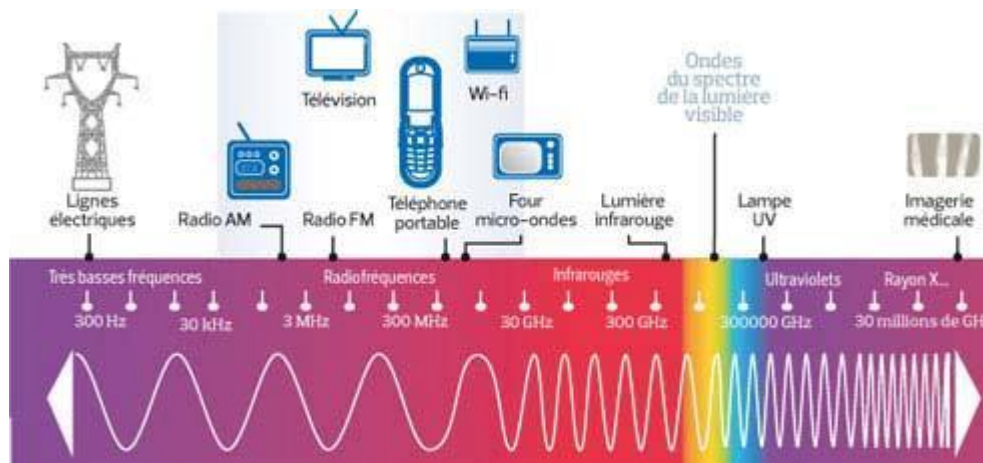


Figure 21 : Le spectre électromagnétique

Dans le contexte d'un EMF non ionisant, il existe de nombreux types d'appareils avec différentes caractéristiques qui ont pour but de réduire la douleur et/ou d'accélérer la guérison de certaines blessures. Ces appareils privilégient souvent de façon indépendante les champs électriques et/ou magnétiques pour induire des effets physiologiques. Parmi les appareils sur le marché, plutôt basés sur l'application de champs électriques continus ou variables (sans caractérisation effective du champ magnétique), on retrouve les appareils d'électrothérapie comme les TENS (Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation), les IFC (Interferential Current Therapy) ou la NMES (Neuromuscular Electrical Stimulation).

Par ailleurs, on distingue différents appareils EMF caractérisés plutôt par l'application de champs magnétiques statiques ou variables (sans caractérisation effective du champ électrique).

Ces appareils sont répartis suivant 5 catégories selon le type de champ magnétique produit (Markov, 2007) :

- les champs statiques,
- les champs sinusoïdaux,
- les champs pulsés (PEMF),
- les radiofréquences,
- la stimulation magnétique transcrânienne.

En définissant les caractéristiques d'un EMF, on peut espérer induire des **effets physiologiques** adaptés à certaines régions du corps et à certaines pathologies. Des auteurs ont d'ailleurs introduit le concept de « **fenêtres biologiques** » qui sont des intervalles de fréquence et d'intensité où les champs magnétiques engendrent une réponse biologique significativement supérieure aux autres gammes de fréquence (Markov, 2005).

Les principaux effets revendiqués des EMF sont l'accélération de la guérison de fractures, la diminution de la douleur et la réduction des œdèmes mais on leur reconnaît aussi des effets vasodilatateurs et anti-inflammatoires (Valentinuzzi, 2008).

Malgré les études démontrant l'efficacité et la sécurité des champs magnétiques, cette médecine alternative reste controversée, notamment à cause du manque de renseignement sur les caractéristiques des EMF utilisés dans les études. Sans la définition du champ magnétique généré, il est compliqué d'associer un signal à son efficacité sur des mécanismes cellulaires précis. Cependant, les EMF font partie des appareils de physiothérapie et peuvent être considérés comme un supplément ou une alternative aux médicaments antidouleur classiquement recommandés.

2. Effets sur la douleur

a. Douleurs articulaires et péri-articulaires

La survenue de la douleur est associée à des phénomènes propres à chaque pathologie. Il est important de prendre en compte les caractéristiques de la **douleur** qui peut être **aigüe** ou **chronique** et les différents mécanismes induisant ces deux types de douleur. Par ailleurs, la douleur reste **subjective** ce qui rend sa mesure complexe et très dépendante des sujets.

La caractérisation du signal de l'équipe de Bassett et al. a montré qu'un EMF basses fréquences à 72,5 Hz accélère la guérison de fractures osseuses (Bassett et al., 1977) et a orienté les études sur l'effet des EMF sur les troubles osseux et articulaires, faisant de l'arthrose la pathologie la plus traitée par cette technologie. Pour rappel, l'**arthrose** provoque une douleur chronique liée à un état inflammatoire de l'articulation touchée ; cette douleur est gênante dans la vie quotidienne et évolue avec la maladie.

Ainsi, dans la revue Cochrane de Li et al. incluant 9 essais randomisés contrôlés avec 636 patients présentant de l'arthrose du genou ou des cervicales, un traitement chronique par EMF, d'une durée comprise entre 4 et 26 semaines, a engendré une diminution significative de la douleur de 15 % par rapport au placebo correspondant à un niveau bénéfique modéré (Li et al., 2013). La méta-analyse de Negm et al. a étudié plus précisément les effets des PEMF basses fréquences (< 100 Hz) sur l'arthrose du genou. Elle présente 7 études (entre 1994 et 2011) portant sur 459 patients avec des durées de traitement allant de 2 à 26 semaines et des fréquences de 5 à 100 Hz. Les résultats sur la douleur sont contradictoires car il y a un fort effet placebo mais les 7 études ont montré une amélioration fonctionnelle dans les groupes traités par PEMF (Negm et al., 2013). Plus récemment, la revue de Chen et al. a sélectionné les articles étudiant l'effet des PEMF sur l'arthrose du genou et 8 études randomisées, contrôlées par placebo, ont été sélectionnées. Les auteurs ont conclu sur l'effet bénéfique des PEMF sur les symptômes cliniques de l'arthrose mesurés par WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) mais sans nette amélioration de la douleur (Chen et al., 2019).

Les effets bénéfiques des PEMF sur les douleurs chroniques cervicales, dorsales ou liées à la fibromyalgie ont aussi été démontrés (Paolucci et al., 2020). Cependant, l'effet de diminution de la douleur dans le cadre de la fibromyalgie ne semble pas supérieur à un traitement par placebo (Multanen et al., 2018).

Même si ces études montrent des effets encourageants, il est nécessaire d'en réaliser d'autres sur de plus grandes cohortes et systématiquement contrôlées par un placebo.

b. Effets sur la neuropathie

La NP diabétique engendre des douleurs dans environ 30 % des cas (Davies et al., 2006). Elle se caractérise par des sensations de brûlures et des douleurs lancinantes au niveau des pieds, principalement la nuit. Ceci a un retentissement sur la qualité de vie des patients. Les médicaments préconisés dans la prise en charge de la douleur neuropathique sont peu efficaces (réduction de 30 % de la douleur) et la moitié des patients souffrent d'effets secondaires (Pop-Busui et al., 2017).

D'après ce constat, il paraît important de trouver des thérapies alternatives pour soulager les patients et quelques études ont examiné l'effet des EMF sur les douleurs liées à la NP diabétique.

Dans toutes études portant sur le traitement par EMF (Tableau 7), les auteurs ont démontré une diminution de la **douleur** évaluée par échelle visuelle analogique (EVA) (Weintraub and Cole, 2004). Cependant, cette réduction n'était pas supérieure à un traitement placebo d'une durée de 3 semaines (Wróbel et al., 2008) ou 3 mois (Weintraub et al., 2009) ou à un groupe réalisant des séances d'activité physique pendant un mois (Battecha, 2017). Musaev et al. ont testé deux traitements PEMF avec des fréquences de 10 ou 100 Hz sans noter de différence sur la diminution de la douleur entre les fréquences mais leur traitement était couplé à des massages et de l'activité physique pouvant masquer l'effet du PEMF (Musaev et al., 2003). En 2012, Mirkovic et al. ont démontré un effet supérieur d'un traitement par PEMF à 25 Hz par rapport à 10 Hz sur la douleur chez des sujets DT2 avec NP (Mirkovic et al., 2012).

Dans ces deux études, les scores portant sur les **symptômes de la neuropathie** (TSS- Total Symptom Score et MNSI) ont été diminués mais les fréquences des PEMF n'ont pas eu d'effet différent sur l'amélioration des symptômes (Mirkovic et al., 2012; Musaev et al., 2003). Wróbel et al. ont démontré une amélioration de la **qualité de vie** et de la **qualité de sommeil** après un traitement de 20 minutes par jour, 5 jours par semaine pendant 3 semaines ; cependant, ce résultat n'était pas différent du groupe placebo (Wróbel et al., 2008). Dans l'étude de Weintraub et al., il a été rapporté une amélioration supérieure du **PGIC (Patient Global Impression of Change)** dans le groupe traité par EMF sinusoïdal comparé au placebo (Weintraub et al., 2009). Cette amélioration du PGIC était corrélée avec la **densité de fibres nerveuses épidermiques** mesurée par biopsie. Après 3 mois de traitement par PEMF, la densité de fibres nerveuses épidermiques n'était pas modifiée alors qu'elle tendait à être diminuée dans le groupe placebo ($p=0.08$). Ce résultat est encourageant et pourrait démontrer un ralentissement dans la progression de la NP (Weintraub et al., 2009).

La **conduction nerveuse** est un paramètre souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un traitement dans la NP. Il a été démontré que le traitement par PEMF n'avait pas d'effet sur la conduction nerveuse (Wróbel et al., 2008) ou que l'amélioration n'était pas différente d'une prise en charge par l'activité physique seule (Battecha, 2017). En revanche, Musaev et al., en 10 jours, ont noté une amélioration significative de la conduction nerveuse dans leur groupe traité à 10 Hz (Musaev et al., 2003). L'intensité de leur champ magnétique était plus élevée que les deux autres études (8 mT vs à 2 mT et 100 μ T) et pour une fréquence plus basse (10 Hz comparé à 50 et 180 Hz) pouvant expliquer les meilleurs résultats obtenus.

L'utilisation de massage et la pratique d'activité physique en complément du traitement par PEMF peuvent aussi expliquer leur résultat sur la conduction nerveuse (Musaev et al., 2003) d'autant plus, qu'il a aussi été démontré qu'un traitement de 12 jours par PEMF avec des fréquences plus élevées (600 et 800 Hz) améliorerait la vitesse de conduction et diminuait la latence de la réponse nerveuse comparé à un groupe placebo (Graak et al., 2009). Plus récemment, ces résultats bénéfiques d'un traitement par PEMF de 4 semaines sur la douleur et la conduction nerveuse ont été démontrés comme équivalents à un traitement par thérapie Laser (Mohamed et al., 2017).

Même si les résultats de ces études sont encourageants, l'inclusion d'un groupe placebo n'a été réalisée que dans la moitié des études et même si les études utilisent des EMF dans des gammes semblables (basses fréquences et intensités de champs magnétiques de l'ordre du milli Tesla), leurs caractéristiques sont néanmoins différentes.

Les mécanismes physiologiques, responsables des effets rapportés, restent encore incertains mais quelques études cellulaires et expérimentales chez l'animal ont apporté quelques hypothèses.

Tableau 7 : Bilan de la littérature sur l'effet d'un traitement par PEMF sur la douleur chez des patients diabétiques avec neuropathie douloureuse

Auteurs	Sujets	Champ magnétique	Intervention	Résultats
Musaev et al., 2003 <i>Neuroscience and behavioural physiology</i>	- 15 NP (PEMF 100 Hz) - 15 NP (PEMF 10 Hz)	PEMF 8 mT	Séance : 10 - 15 min 10 fois / jour Durée : ?	- EVA : ↘ ns entre groupe - TSS : ↘ ns entre groupe - ENMG : ↗ supérieur PEMF 10 Hz
Weintraub and Cole, 2004 <i>Neurorehabilitation and neural repair</i>	- 24 NP (dont 6 NP diabétique)	PEMF 2 mT – 30 Hz	Séance : 1 h / jour Durée : 9 jours	- EVA : ↘
Wróbel et al., 2008 <i>Diabetes & metabolism</i>	- 32 NP (PEMF) - 29 NP (Sham)	PEMF 100 µT – 180-195 Hz	Séance : 20 min / jour 5 jours / semaine Durée : 3 semaines	- EVA : ↘ ns entre groupe - Conduction nerveuse : ns - Qualité de vie et sommeil : ↗ ns entre groupe
Weintraub et al., 2009 <i>Archive of physical medicine and rehabilitation</i>	- 90 NP (PEMF) - 104 NP (Sham)	Sinusoïdal 180 mT	Séance : 10 à 30 min 2h / jour Durée : 3 mois	- EVA : ↘ ns entre groupe - PGIC : ↗ supérieur PEMF vs Sham - Biopsie nerveuse : tendance amélioration PEMF (p=0.08)
Graak et al., 2009 <i>International journal of diabetes in developing countries</i>	- 10 NP (PEMF 600 Hz) - 10 NP (PEMF 800 Hz) - 10 NP (usual drugs)	?	Séance : 30 min / jour Durée : 12 jours	- EVA : ↘ supérieure dans les gp PEMF vs usual drugs - Conduction nerveuse : Amélioration supérieure dans les gp PEMF vs usual drugs
Mirkovic et al., 2012 <i>Journal of Society for development in new net environment in B&H</i>	- 28 NP (PEMF 10 Hz) - 43 NP (PEMF 25 Hz)	PEMF 0,5 – 10 mT	1 séance?	- EVA : ↘ ns entre groupe - MNSI : ↘ ns entre groupe
Battecha et al., 2016 <i>Bulletin of faculty of physiological therapy</i>	- 15 NP (PEMF + exercice) - 15 NP (exercice)	PEMF 2 mT 50 Hz	Séance : 20 min 3 fois / semaine Durée : 1 mois	- EVA : ↘ ns entre groupe - Conduction nerveuse : ↗ ns entre groupe

NP, Neuropathie périphérique ; PEMF, champs magnétiques pulsés ; EVA, échelle visuelle analogique ; TSS, total symptoms score ; ENMG, électroneuromyographie ; Sham, placebo ; PGIC, patient global impression of change ; MNSI, Michigan Neuropathy Screening Instrument ; ↗, augmentation ; ↘, diminution ; ns, non significatif.

c. Explications des effets sur la neuropathie

La régénération axonale

Les bienfaits constatés sur la conduction nerveuse dans plusieurs études démontrent que les nerfs ont amélioré leur fonction à transmettre un signal électrique. La transmission du signal repose sur l'intégrité du nerf et de sa gaine de myéline or, il est reconnu que la NP provoque une démyélinisation et progressivement une dégénérescence axonale (Lauria and Devigili, 2007; Malik et al., 2005).

L'application de PEMF, sur des rats ayant subi un dommage du nerf sciatique par écrasement, a accéléré et amélioré la récupération physique mesurée par conduction nerveuse et morphologique puisque la structure des axones était quasiment normale (Mert et al., 2006). L'étude de Lei et al. sur un modèle de rats rendus diabétiques par streptozotocine a montré que l'application de PEMF diminuait la démyélinisation axonale et la présence de VEGF, marqueur du développement de la NP (Lei et al., 2013).

Ces résultats suggèrent que les PEMF pourraient améliorer la douleur et les symptômes de la NP et être une thérapie alternative aux traitements médicamenteux (Mert, 2017).

Théorie du gate control

La théorie du « gate control » a été formulée par les créateurs de la neurostimulation transcutanée. Selon cette hypothèse, un courant électrique envoyé aux nerfs périphériques bloquerait le passage de l'information douloureuse vers le cerveau (Melzack and Wall, 1965). Certains auteurs supposent que le champ magnétique, qui génère un courant induit dans les tissus qu'il traverse, pourrait jouer sur la dépolarisation, repolarisation ou hyperpolarisation des neurones (Wróbel et al., 2008).

De manière indirecte et afin de mimer la théorie du gate control, des auteurs ont étudié l'effet des EMF sur la perception d'une douleur induite chez les sujets sains. En 1997, Sartucci et al. ont analysé la réponse somatosensorielle à une stimulation électrique cutanée douloureuse et ont observé que l'amplitude de cette réponse était diminuée après exposition à un EMF, alors qu'elle ne change pas après exposition à un placebo (Sartucci et al., 1997). Shupak et al. ont montré une élévation du seuil de douleur thermique après exposition de 30 minutes à un EMF sans différence avec le groupe traité avec un placebo. En revanche, ils n'ont pas noté de changement sur le seuil de sensibilité thermique quel que soit le groupe (Shupak et al., 2004).

Plus récemment, Beaulieu et al. n'ont pas démontré de différence sur le seuil de douleur thermique après application de PEMF (Beaulieu et al., 2016). Ce résultat leur permet de suggérer que l'effet des champs magnétiques sur la douleur n'est pas direct mais plutôt indirect par un effet sur l'inflammation et/ou sur des mécanismes cellulaires.

Effets cellulaires

Le champ magnétique génère un courant qui provoque le mouvement des particules chargées comme les ions. Ainsi, Panagopoulos et al. ont émis l'hypothèse qu'en présence d'un EMF, les ions vibraient autour de la membrane cellulaire donnant de faux signaux aux canaux membranaires (Panagopoulos et al., 2002). Cela permettrait le passage de certains ions de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule ou l'inverse et jouerait sur l'activité cellulaire en fonction des voies de signalisation propres à chaque ion (Wade, 2013).

Ainsi, les EMF auraient des actions au niveau cellulaires et pourraient avoir un impact sur l'inflammation. En effet, plusieurs études ont rapporté une diminution d'IL-1 β (Interleukine-1 β , cytokine pro-inflammatoire) après application d'un PEMF sur des fibroblastes en culture (Kubat et al., 2015), ou chez le rat rendu diabétique par streptozotocine (Mert et al., 2015) mais aussi dans l'exsudat d'une plaie à 5 h post-opératoire (Rohde et al., 2010).

Dans l'étude de Mert et al. sur des rats, les niveaux de TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et IL-6 étaient diminués par rapport au groupe de rats non traités par PEMF et le niveau d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) était augmenté. Cette étude a démontré les effets bénéfiques des PEMF sur le statut inflammatoire (Mert et al., 2015).

Il a aussi été rapporté que l'application d'un EMF augmente la libération de NO dans une culture de cellules dopaminergiques après provocation au LPS (lipopolysaccharide) (Figure 22 A). Cette augmentation est due à la liaison du Ca²⁺ à la calmoduline (CaM) qui stimule la eNOS. L'ajout d'un antagoniste de CaM (W-7) inhibe le relargage du NO, même en présence d'un EMF (Figure 22 B) (Pilla, 2013).

La stimulation du relargage du NO par l'application d'un EMF peut provoquer une relaxation vasculaire et pourrait contribuer à l'amélioration du statut inflammatoire. Il pourrait aussi être une explication dans l'accélération de la guérison des fractures et/ou des plaies. Cet effet pourrait aussi améliorer la microcirculation qui est une des causes majeures du développement de la NP.

Cependant, ces types de dosage sont rarement retrouvés dans les études cliniques où l'accent est mis sur la prise en charge de la douleur et des symptômes.

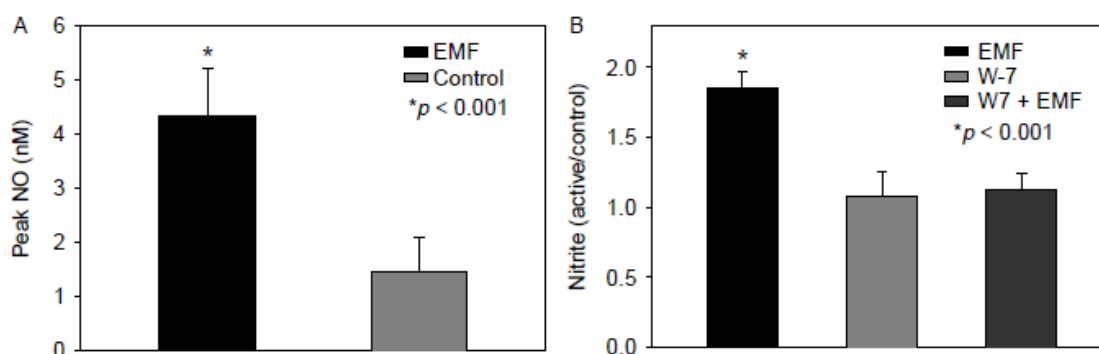


Figure 22 : Effet des EMF sur le relargage de NO dans une culture de cellules dopaminergiques stimulées par LPS (A) et après blocage de la calmoduline par W-7 (B) (Pilla et al., 2013)

3. Effets sur la microcirculation

a. Chez le sujet sain

Les études portant sur l'effet des EMF sur la **microcirculation** rapportent des résultats contradictoires. Il convient de s'intéresser aux champs magnétiques variables et pas aux champs magnétiques statiques qui n'ont pas démontré d'effets sur la microcirculation (Martel et al., 2002; Mayrovitz et al., 2001; Ohkubo and Okano, 2015).

En expérimentation animale, des études ont démontré une augmentation du diamètre artériolaire de 9 % sur un muscle crémaster de rat après 1 h d'application locale de PEMF (18,8 T/s) (Smith et al., 2004) ou une amélioration de la circulation après exposition de 6 h par jour pendant 4 semaines à un PEMF (5 mT à 10 Hz) sur une lésion ligamentaire chez le lapin (Lin et al., 1993). Contrairement à cela, d'autres études sur le rat n'ont montré aucun effet d'une application de PEMF (225 μ T à 72 Hz) sur la réponse microcirculatoire à l'ACh (McKay et al., 2009).

Ces résultats contradictoires sont aussi retrouvés dans les études cliniques. McNamee et al. n'ont montré aucun changement du CBF lors de l'application d'un PEMF en aigu par rapport au CBF basal chez des sujets sains et ce, pour des champs magnétiques de 200 μ T et 1800 μ T à 60 Hz (McNamee et al., 2010, 2011). Ueno et al. n'ont pas non plus rapporté de changement sur le CBF au niveau du doigt pendant l'application d'un PEMF (16 mT à 3,8 kHz) dans leur étude pilote sur deux volontaires seulement (Ueno et al., 1986). Enfin, Schufried et al. ont réalisé, sur les jambes, des séances de 30 minutes de deux champs magnétiques d'intensité et fréquence différentes (100 μ T à 30 Hz et 8.4 mT à 10 Hz) et d'une application placebo, espacées d'une semaine chacune et n'ont montré aucune différence entre ces trois applications au niveau du CBF et de la température cutanée (Schuhfried et al., 2005).

Cependant, deux études ont montré une augmentation de la microcirculation. Mayrovitz et al. ont démontré une augmentation du CBF sur le bras traité par PEMF comparé au bras non traité. Ils ont aussi noté une augmentation de la température cutanée sur le bras traité et ne peuvent pas exclure que le champ magnétique ait provoqué une augmentation de la température cutanée conduisant à une vasodilatation (Mayrovitz and Larsen , 1992). Plus récemment, Funk et al. (2014), utilisant un appareil portable générant un champ magnétique de 10-15 mT à fréquences variables (4 à 12 Hz), ont montré une augmentation de perfusion au niveau des doigts chez des sujets sains après 5 minutes d'exposition (Funk et al., 2014). Pour expliquer cette augmentation, ils ont exposé des cellules endothéliales (HUVEC-Human umbilical vein endothelial cells) à leur appareil et ont montré une augmentation de 24 % de relargage de NO (Funk et al., 2014).

L'effet des EMF sur le NO a aussi été rapporté chez l'animal (Diniz et al., 2002; Pilla, 2012). Il a aussi été montré par Tepper et al., une augmentation de la prolifération cellulaire endothéliale et du facteur pro-angiogénique FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) sur des cellules endothéliales exposées à un PEMF (15 mT à 15 Hz) (Tepper et al., 2004). Tous ces éléments vont dans le sens d'une amélioration vasculaire par vasodilatation médiée par le NO ou par stimulation de l'angiogenèse après une exposition aux EMF. De manière expérimentale, Tao et al. ont mesuré la viscosité sanguine dans des tubes et ont démontré que le champ magnétique diminuait la viscosité. Leur hypothèse était que les globules rouges contenant de l'hémoglobine riche en fer seraient paramagnétiques et s'orienteraient en présence de champs magnétiques facilitant leur passage dans les vaisseaux (Tao and Huang, 2011).

Tous ces résultats positifs dans des modèles animaux et chez des sujets sains sont primordiaux dans des pathologies présentant des dysfonctions vasculaires. L'amélioration de la microcirculation est un enjeu majeur dans le diabète et en présence de NP pour limiter l'ischémie des nerfs périphériques mais aussi pour prévenir la survenue d'ulcères.

b. Chez le patient diabétique

Le développement de la NP est associé à des altérations microcirculatoires. L'amélioration de la microcirculation pourrait avoir un impact positif sur la survenue de la NP, sa progression ou le développement de complications plus sévères comme les ulcères. Cependant les études sur ce sujet sont peu nombreuses (Tableau 8).

Lors d'une **application aigüe** de 30 minutes d'un PEMF (0.5 mT à 12 Hz), il a été démontré une augmentation de la vitesse du flux sanguin dans les capillaires superficiels (Sun et al., 2016), de la microcirculation cutanée mesurée par LDF au niveau du dos du pied et de la pression en oxygène transcutanée (par TcPO₂) par rapport à un groupe placebo (Webb et al., 2003). Dans une population de jeunes DT1, Nikolaeva et al. ont démontré une augmentation de la conduction nerveuse et de la microcirculation après 15 minutes de PEMF (45 mT à 16 Hz) au niveau des jambes par rapport à un groupe traité par placebo. L'analyse spectrale du signal LDF a montré une diminution de la composante neurogénique et une augmentation de la composante respiratoire après l'application du PEMF (Nikolaeva et al., 2010).

En **chronique**, une étude portant sur des sujets avec syndrome métabolique a montré une diminution du pic de pression artérielle lors d'un exercice incrémental dans le groupe traité par PEMF (0,2 mT à 30 Hz) pendant 12 semaines, avec une augmentation de NO dans leur plasma (Kim et al., 2020). Au repos, une diminution de la pression artérielle a été notée dans un sous-groupe de sujets hypertendus. Une étude de la même équipe sur des sujets hypertendus a démontré une amélioration de la réponse au FMD (Flow-Mediated Dilatation) après ce même traitement par PEMF comparée à un groupe traité par placebo (Stewart et al., 2020). Une seule étude chronique a été menée chez des sujets DT2 avec une NP. Ils ont rapporté une amélioration de la pression de perfusion cutanée à l'orteil après 60 jours de PEMF, mais le nombre de sujets ayant terminé l'étude est faible, rendant l'analyse des résultats peu fiable (Aj et al., 2017).

Même s'il n'existe pas d'études cliniques ayant testé l'effet d'un traitement par PEMF sur des paramètres circulatoires chez un nombre suffisant de sujets atteints de NP, les résultats d'études expérimentales sont encourageants. En effet, Kavak et al. ont montré une amélioration de la relaxation d'anneaux d'aorte de rats diabétiques après un traitement par PEMF (5 mT à 50 Hz) de 30 minutes, 4 fois par jour pendant 1 mois (Kavak et al., 2009). Pan et al. sur un modèle de rats diabétiques avec ischémie des pattes arrières, exposés à un PEMF (1,2 mT à 15 Hz) pendant 8 h par jour, ont montré une augmentation de la perfusion des pattes arrière dès 14 jours de traitement par rapport à un groupe traité par placebo. Ils ont aussi noté une augmentation de CD31 (marqueurs de cellules endothéliales) et de FGF-2 (Pan et al., 2013).

Ces résultats suggèrent qu'un traitement par PEMF stimule l'angiogenèse et pourrait être une stratégie efficace dans la prise en charge des ulcères du pied diabétique.

La littérature sur l'effet d'une prise en charge des **ulcères diabétiques** par PEMF est elle aussi peu fournie (Tableau 8). En 1992, Mayrovitz et al. avaient démontré une augmentation de la microcirculation en périphérie d'ulcères diabétiques en une seule séance de 45 minutes de PEMF (1 mT à 25,12 MHz) (Mayrovitz and Larsen, 1995). Plus récemment, l'étude randomisée en double aveugle avec un groupe placebo de Kwan et al. a montré une diminution de l'aire de la zone ulcérée sans différence significative entre les groupes. En revanche, la profondeur de l'ulcère était réduite dans le groupe traité par PEMF (12 mT à 12 Hz) par rapport au groupe traité par placebo, après 14 sessions de 1h sur 3 semaines de traitement. Aucune différence significative des paramètres microcirculatoires n'a été démontrée à la fin du traitement. De manière intéressante, l'augmentation du diamètre capillaire et de la vélocité du flux sanguin capillaire était supérieure dans le groupe traité par PEMF comparé au placebo, 1 mois après la fin du traitement (Kwan et al., 2015). L'effet microcirculatoire de l'application d'un EMF pourrait s'observer à long terme et le manque de significativité sur ces paramètres à la fin du traitement pourrait être dû au faible nombre de sujets par groupe (PEMF n=7 ; Placebo n=6).

L'accélération de la guérison de plaies par PEMF chez des rats diabétiques a aussi été démontrée et il a été rapporté une augmentation de FGF-2 (Callaghan et al., 2008), des myofibroblastes et de collagène dans les tissus de la plaie (Cheing et al., 2014; Choi et al., 2016).

L'application d'un PEMF a donc des effets bénéfiques sur la guérison d'ulcères diabétiques mais aussi d'autres types d'ulcères (Ieran et al., 1990; Stiller et al., 1992). Pour autant, les liens avec une augmentation de microcirculation ne sont pas clairement établis.

Tableau 8 : Bilan de la littérature sur l'effet d'un traitement par PEMF sur la microcirculation chez des patients diabétiques ou présentant des ulcères

Auteurs	Sujets	Champ magnétique	Intervention	Résultats
Mayrovitz et al., 1995 <i>Wounds</i>	- 15 DFU	PEMF sur DFU 1 mT 27,12 MHz	Séance : 45 min <i>LDF à 1 cm DFU</i>	- PU : ↗ - T° : ns
Webb et al, 2003 <i>The diabetic foot journal</i>	- 14 DT2 (PEMF) - 12 DT2 (sham)	PEMF application pied 0,5mT – 12Hz	Séance : 30 min <i>Face dorsale pied</i>	- PU : ↗ supérieure PEMF vs Sham - TcPO2 : ↗ supérieure PEMF vs Sham
Nikolaeva et al., 2010 <i>Neuroscience and behavioural physiology</i>	- 23 DT1 (PEMF) - 22 DT1 (sham) (<i>Young DT1</i>)	PEMF application jambes 45 mT 16 Hz	Séance : 15 min <i>Face dorsale pied</i>	- PU : ↗ supérieure PEMF vs Sham ↗ Neuro ↘ Respi (pendant application PEMF) - Conduction nerveuse : ↗ supérieure PEMF vs Sham
Kwan et al., 2015 <i>Advance in skin and wound care</i>	- 7 DFU (PEMF) - 6 DFU (sham)	PEMF sur DFU 12 mT 12 Hz	Séance : 60 min 14 séances Durée : 3 semaines <i>Pulpe hallux</i> <i>LDF/capillaroscopie</i>	- Aire DFU : ↘ ns entre groupe - Profondeur : ↘ supérieure PEMF vs Sham - PU LDF : ↗ ns entre groupe - Flux capillaire : ↗ vitesse et diamètre PEMF uniquement
Sun et al., 2016 <i>Bioelectromagnetics</i>	- 22 DT2 11 PEMF / 11 sham - 21 CT 11 PEMF / 10 sham	PEMF sur le pied 0,5 mT - 12 Hz	Séance : 30 min <i>Face dorsale pied</i>	- PU –LDF : ns - CBF - UBM : ↗ vitesse dans les gp PEMF

DFU, Diabetic foot ulcers ; PEMF, champs magnétiques pulsés ; PU, perfusion ; T°, température cutanée ; DT2, Diabétiques de type 2 ; Sham, placebo ; TcPO2, pression en O₂ transcutanée ; DT1, Diabétique de type 1 ; Neuro, bande de fréquence neurogérique ; Respi, bande de fréquence respiratoire ; LDF, Laser Doppler Flowmeter ; CT, sujets contrôles ; UBM, ultrasound biomicroscopy ; ↗, augmentation ; ↘, diminution ; ns, non significatif.

4. Conclusion sur l'effet des champs magnétiques

La thérapie par EMF est encore très controversée aujourd'hui car il existe peu d'études scientifiques robustes qui prouvent leurs effets thérapeutiques et qui n'identifient pas clairement les phénomènes biologiques mis en jeu.

Cependant, les résultats des traitements par PEMF sont encourageants dans la prise en charge de la douleur neuropathique où les traitements pharmacologiques échouent souvent et induisent de nombreux effets secondaires. L'avantage de l'utilisation des champs magnétiques repose sur une technique non-invasive et sans contact nécessaire avec la peau contrairement à d'autres traitements plus répandus comme l'électrothérapie (Markov, 2007). Par ailleurs, le traitement par PEMF provoque très peu d'effets secondaires (Dennis, 2019).

Les études ont montré aussi une amélioration des symptômes de la NP et parfois de la conduction nerveuse dont l'explication pourrait être une amélioration de la microcirculation mais les données à ce sujet sont peu nombreuses et le lien n'est pas précisément démontré.

Pourtant, l'amélioration de la microcirculation pourrait diminuer le risque de développer une NP ou au moins diminuer la progression des symptômes. Ceci serait un vrai avantage dans la prise en charge qui reste à ce jour uniquement symptomatique. Même en cas de complications plus graves comme les ulcères qui sont la cause principale d'amputations non-traumatiques dans le monde (IDF Diabetes Atlas , 2019), les EMF semblent impacter positivement la guérison en accélérant la cicatrisation.

Finalement, il est important de noter que la qualité des papiers sur les champs magnétiques n'est pas bonne. Peu d'études comparent leur traitement à un groupe placebo, le traitement statistique des résultats est sommaire et la description du protocole et des caractéristiques des EMF utilisés ne sont pas toujours présentes. Ce manque de précisions dans les études cliniques rend l'interprétation des résultats complexe et il convient de mener de nouvelles études rigoureuses pour espérer proposer les champs magnétiques comme un complément thérapeutique dans la prise en charge actuelle de la NP.

C'est pourquoi notre dernière étude randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo, a examiné les effets antalgiques et microcirculatoires, aigus et chroniques, d'un traitement par PEMF chez des sujets avec NP douloureuse.

Contributions personnelles

Partie 1. Objectifs

Les dysfonctions microcirculatoires sont impliquées dans le développement de la NP. De nombreux papiers étudient la microcirculation cutanée car elle est représentative de la fonction microvasculaire générale (Holowatz et al., 2008) et facilement accessible. Le LDF et le LSCI sont des outils non-invasifs d'exploration de cette microcirculation cutanée et permettent, par l'analyse fréquentielle du signal, l'étude du flowmotion et de ses mécanismes de contrôle. Malgré les nombreuses études sur le flowmotion avec le LDF, aucune recommandation sur la durée d'enregistrement nécessaire pour faire une analyse spectrale fiable n'est disponible (Martini and Bagno, 2018). Même si les auteurs s'accordent sur une durée d'enregistrement d'au moins 20 minutes, ce temps n'a jamais été validé. Dans le cadre de notre étude NEUROMICRO qui comprend un enchaînement de plusieurs stimuli sur une population pathologique, il convenait de minimiser ce temps au maximum. En effet, les patients DT2 avec NP ont des symptômes de fourmillement ou des douleurs dans les jambes qui peuvent gêner le maintien d'une position immobile fondamentale pour un enregistrement de qualité sans artefacts.

Ce constat a donné lieu à la première étude de cette thèse dont l'objectif était de proposer une recommandation sur le temps d'enregistrement LDF minimum nécessaire pour réaliser une analyse fiable du flowmotion au repos chez des sujets sains en comparant les signaux des bandes basses fréquences de la période d'enregistrement de référence de 20 minutes à des signaux raccourcis au niveau de l'avant-bras et du pied.

(Etude FLOWMOTION)

L'analyse fréquentielle des signaux LDF permet d'observer distinctement les mécanismes contrôlant le flowmotion. Chez les DT2, il a été démontré des altérations sur certaines bandes de fréquence au repos (Hu et al., 2017; Sun et al., 2012, 2013). Il a aussi été rapporté des réponses microcirculatoires diminuées chez les DT2 avec NP, cependant, l'analyse des mécanismes sous-jacents est rare et s'arrête souvent aux seules données de perfusion (Park et al., 2016). Or, la compréhension des mécanismes responsables des dysfonctions chez les DT2 avec ou sans NP est primordiale.

En ce sens, l'objectif de la deuxième étude de thèse était de comparer les variations des perfusions cutanées et de flowmotion pendant la récupération post-test de marche de 6 minutes chez des sujets obèses, des sujets sains et des sujets DT2 avec ou sans NP.

L'objectif de la troisième étude était de comparer les variations des perfusions cutanées et de flowmotion suite à la mise en déclivité du pied chez des sujets obèses, des sujets sains et des sujets DT2 avec ou sans NP afin d'explorer les mécanismes impliqués dans le réflexe veino-artériolaire.

(Etude NEUROMICRO)

Enfin, la présence de douleur est fréquente chez les DT2 présentant une neuropathie (Abbott et al., 2011). Les traitements pharmacologiques manquent d'efficacité et provoquent des effets secondaires ; en plus, ils sont uniquement symptomatiques (Pop-Busui et al., 2017). La proposition d'un traitement alternatif non pharmacologique, comme les champs magnétiques, est prometteur, son effet antalgique pourrait être expliqué par son effet potentiel d'amélioration de la microcirculation (Mert, 2017).

Ainsi, notre dernière étude randomisée, en double aveugle, contrôlée par placebo, a pour objectif d'étudier les effets antalgiques et microcirculatoires d'un traitement aigu et chronique par PEMF chez des sujets avec NP douloureuse.

(Etude PAIN)

Partie 2. Matériels et méthodes

1. Patients et critères d'inclusion-exclusion

Etude FLOWMOTION

Soixante-cinq participants (34 hommes et 31 femmes) ont été recrutés par affichage interne à l'Université d'Avignon. Les participants devaient avoir entre 20 et 60 ans, être non-fumeurs et sans antécédents de pathologies métaboliques ou cardiovasculaires. Cette étude méthodologique a été menée en accord avec les bonnes pratiques cliniques et la déclaration d'Helsinki.

Etude NEUROMICRO

L'accord favorable de cette étude n° IDRCB 2018-A03170-55 a été émis le 14 janvier 2019 par le comité de protection des personnes (CPP) Ile-de-France VI. Elle a été déclarée sur le site ClinicalTrials.gov sous le numéro NCT 03847779.

Cinquante-trois patients DT2 ont été inclus au cours de leur hospitalisation dans le service d'Endocrinologie et Maladies Métaboliques du centre hospitalier Henri Duffaut d'Avignon. Les 38 sujets témoins (**22 obèses** appariés en âge et en indice de masse corporelle (IMC) et **16 sujets sains normo-pondérés** appariés en âge) ont été inclus et recrutés par publications sur le site du CHA, de l'université et des réseaux sociaux. Les critères d'inclusion étaient d'avoir entre 40 et 70 ans, de ne prendre aucun traitement pouvant affecter la microcirculation (vasodilatateurs périphériques, inhibiteurs calciques...) et de donner son consentement libre et éclairé en signant le formulaire. Les sujets témoins ne devaient pas avoir de pathologies métaboliques ou cardiovasculaires et pas d'HTA. Les DT2 ne devaient pas avoir de plaie du pied, d'AOMI et de neuropathies périphériques d'origine non diabétique (alcoolique, Vitamine B12). En revanche, leur HbA1c devait être comprise entre 7 et 10 % et ils devaient être en capacité de réaliser un test de marche de 6 minutes.

Etude PAIN

Cette étude confidentielle a reçu l'avis favorable du CPP Ile-de-France VII le 16 décembre 2019 et l'autorisation de l'ANSM le 3 janvier 2020.

Au total, 9 patients ont été recrutés par le biais des médecins du service d'Endocrinologie et Maladies Métaboliques du Centre Hospitalier d'Avignon. Sur ces 9 patients, 2 n'ont pas pu effectuer la deuxième visite à cause de la pandémie de COVID-19 et le recrutement est encore en cours pour atteindre le nombre de 12 sujets prévu initialement.

Les **patients diabétiques (5 DT2 et 2 DT1)** devaient avoir entre 40 et 75 ans et une **NP douloureuse** identifiée avec un score DN4 ≥ 4 . Ils devaient signer le formulaire de consentement. Les critères d'exclusion étaient ceux liés à l'utilisation des champs magnétiques, à savoir le port d'un pacemaker, la présence de tumeurs évolutives, les femmes enceintes et les implants ferromagnétiques ou infections sur la zone traitée.

2. Déroulement des études

Quelle que soit l'étude, une période d'**acclimatation** à la température de la pièce (22-25 °C) d'au moins 10 minutes a été respectée avant le début des protocoles. Il avait été demandé aux participants de ne pas manger et boire de café au moins 2 h avant la participation à l'étude, de ne pas fumer 12 h avant et de s'abstenir de pratiquer une activité physique intense dans les 24 h précédentes.

Etude FLOWMOTION

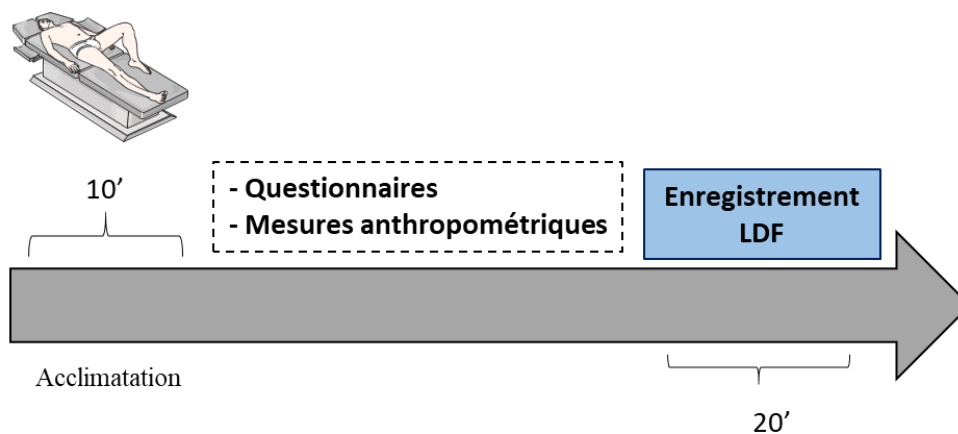


Figure 23 : Déroulement de l'étude FLOWMOTION

En **position allongée**, deux sondes LDF chauffées à 32 °C étaient placées, l'une au niveau de la face antérieure de l'avant-bras et l'autre, au niveau du dos du pied (entre le 2^{ème} et 3^{ème} métatarse) enregistrant la microcirculation au **repos pendant 20 minutes** (Figure 23).

Etude NEUROMICRO

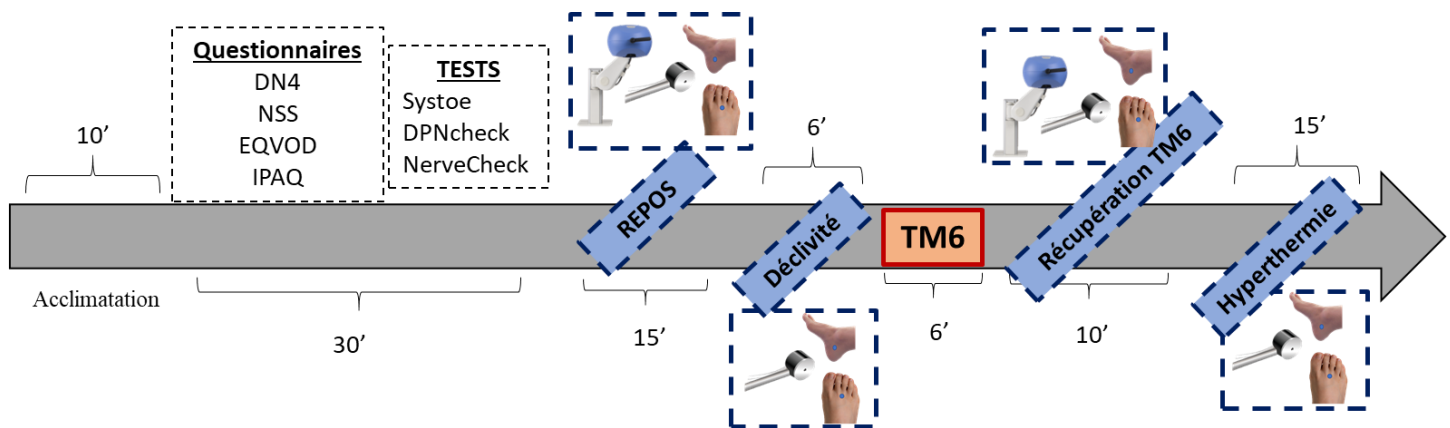


Figure 24 : Déroulement de l'étude NEUROMICRO

Comme présenté sur la figure 24, les patients commençaient par répondre aux **questionnaires** de caractérisation de la NP, qualité de vie et niveau d'activité physique, puis leurs **sensibilités** vibratoire et thermique étaient testées ainsi que la **conduction** du nerf sural. Ensuite, différents stimuli ont été utilisés pour provoquer des réactions vasodilatatrices ou vasoconstrictrices. Tous les enregistrements LDF et LSCI ont été réalisés en **position allongée**, sur le pied droit sauf contraintes particulières sur ce pied (blessure récente, opération sur la jambe). Après 15 minutes d'enregistrement LDF (une sonde sur le dessus du pied entre le 2ème et 3ème métatarse et l'autre en dessous de la malléole interne) et LSCI (sur le dessus du pied) au **repos**, l'enregistrement LDF était poursuivi pendant 6 minutes avec le pied en **position déclive**, afin de provoquer le VAR. Les emplacements des sondes sur le pied étaient marqués au feutre afin de les replacer au même endroit après le **test de marche de 6 minutes** (TM6). En moins de 2 minutes après le TM6, les participants se réinstallaient sur le lit, les sondes LDF et la caméra LSCI étaient replacées. La microcirculation (LDF et LSCI) était alors enregistrée pendant 10 minutes de récupération post-TM6. Enfin, une **hyperhémie thermique locale** était provoquée par augmentation de la température des sondes LDF à 42 °C pendant 15 minutes.

Mise en déclivité du pied

Après la période d'enregistrement au repos, il était demandé aux patients de passer leur jambe droite sur le côté du brancard et de laisser pendre leur pied par flexion du genou, tout en restant allongé (Khiabani et al., 2000).

Test de marche de 6 minutes

Le TM6 est un test simple, fiable et validé permettant d'évaluer la capacité fonctionnelle des participants. Ce test a été réalisé dans un couloir de 25 mètres, en suivant les recommandations de l'American Thoracic Society (ATS Statement, 2002). Les participants ont réalisé ce test en chaussettes antidérapantes (afin de réduire le temps de retour en position allongée pieds nus après le TM6) et ont été équipés d'un cardiofréquence-mètre. Les sujets ont aussi été interrogés sur leur perception de l'effort à l'aide d'une échelle de Borg visuelle de 0 à 10 (Rosales et al., 2016). La distance parcourue au cours du TM6 a été notée et le pourcentage par rapport à la distance prédite a été calculé par l'équation de Troosters (Troosters et al., 1999).

$$\text{Distance prédite (m)} = 218 + (5,14 \times \text{Taille(m)}) - (5,32 \times \text{Âge}) - (1,80 \times \text{poids(kg)}) + (51,31 \times \text{sexe})$$

(1 pour les femmes / 2 pour les hommes)

Lorsque la distance parcourue est inférieure à 82% de la distance prédite, la capacité fonctionnelle est considérée comme dégradée (Troosters et al., 1999).

Test d'hyperémie thermique locale

Après la période de récupération post-TM6 de 10 minutes, les sondes LDF ont été chauffées avec une augmentation progressive d'1 °C par seconde jusqu'à 42 °C. Cette méthode permet de provoquer la réponse microcirculatoire biphasique avec un pic initial axonal et un plateau de vasodilatation (Minson et al., 2001). La température était ensuite maintenue pendant 15 minutes.

Etude PAIN

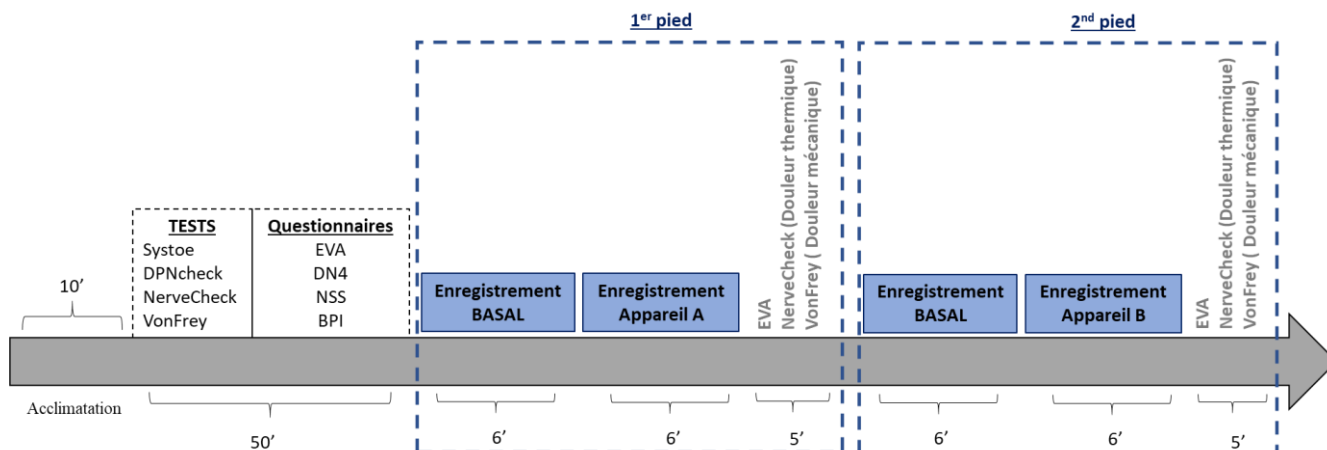


Figure 25 : Déroulement des visites de début et de fin de l'étude PAIN

Les patients recrutés ont rempli des **questionnaires** sur les symptômes de la NP et sur la douleur. Ils ont réalisé des tests de **conduction nerveuse**, de **sensibilités** (vibratoires et thermiques) et de détection des **seuils de douleurs** thermique et mécanique avant de se voir affecter un appareil de **champs magnétiques** A et B, actif et placebo, respectivement au pied droit et au pied gauche. La randomisation a été effectuée sur My2lbox (<http://my2lbox.com/fr/generateur-groupes-aleatoires>) en affectant les 12 sujets au groupe 1 (Appareil A- Pied droit ; Appareil B- Pied gauche) ou au groupe 2 (Appareil B- Pied droit ; Appareil A- Pied gauche). Cette affectation faite de manière aléatoire est restée la même pendant les 15 jours de traitement. Des enregistrements microcirculatoires LDF et LSCI ont été effectués sur la face dorsale de chacun des pieds au **repos** et **pendant que l'appareil était en fonctionnement**, uniquement lors du premier et du dernier jour de l'étude. Après l'application des appareils, la détection des seuils douloureux a été examinée de nouveau (Figure 25).

Traitement par Champs Magnétiques à domicile

Deux appareils ont été prêtés aux participants **pendant 15 jours**, un **appareil actif** et un **appareil placebo** appelés « Appareil A » et « Appareil B ». Les patients ont donc été traités pendant 2 semaines, à raison de **deux séances de 6 minutes par jour (matin et soir) sous la plante des pieds**, sur l'un des pieds par l'appareil actif et sur l'autre par un placebo créé pour l'étude. Il était conseillé au patient de poser les deux appareils par terre et les pieds dessus comme cela avait été effectué lors du premier jour de l'étude.

Le champ magnétique global maximum généré par l'appareil est de l'ordre de 200 mT \pm 4 mT et atteint des niveaux thérapeutiques jusqu'à 4-5 cm de profondeur.

3. Données anthropométriques

Quelle que soit l'étude, les informations concernant les participants ont été récupérées grâce aux **entretiens** lors des visites d'inclusion. La taille des patients a été mesurée grâce à une toise et ils ont été pesés sur une balance à impédancemétrie Tanita DC-430 MA (Tanita Europe B.V., UK) permettant d'avoir le poids, l'IMC (masse en Kg / (Taille en m)²) et le pourcentage de masse grasse. Les informations concernant l'histoire de la maladie, les complications ou les traitements médicamenteux et les bilans sanguins ont été récupérés dans les dossiers médicaux mis à disposition par l'hôpital.

4. Bilan biologique

Etude NEUROMICRO

Une **prise de sang à jeun** était réalisée en routine dans le service d'endocrinologie pour les patients DT2 pendant leur hospitalisation. De la même manière, il a été demandé aux sujets du groupe obèse de venir faire une prise de sang au laboratoire d'analyse de l'hôpital le matin avant leur participation à l'étude. Le bilan permettait de connaître la glycémie à jeun, l'urée, HbA1c, la créatinine enzymatique, le DFG, les niveaux d'ASAT (ASpartate AminoTransférase), ALAT (ALanine AminoTransférase) et Gamma-GT, mais aussi le cholestérol total, HDL (High Density Lipoprotein), LDL (Low Density Lipoprotein), triglycérides, la ferritine, l'albumine, la micro albuminurie, les vitamines B12 et D (25OH(D)), le fibrinogène et la CPRus.

5. Détection de la neuropathie

Etude NEUROMICRO et PAIN

La NP a été recherchée cliniquement selon les recommandations HAS (Rapport, 2007). L'évaluation de la NP a été qualitative et quantitative selon la classification du consensus de Toronto (Tesfaye et al., 2010). L'évaluation qualitative a comporté un recueil des signes fonctionnels et de douleur, et l'évaluation quantitative un examen des sensibilités vibratoire et thermique et une mesure de conduction nerveuse.

- Le **NSS « Neuropathy Symptom Score »** a permis d'évaluer la sévérité de la NP (Chawla et al., 2013). Il comporte des questions sur les symptômes, leur localisation, leur exacerbation et leur amélioration. Le score total est sur 10 points. Entre 3 et 4/10, la neuropathie est légère, entre 5 et 6/10, modérée et entre 7 et 10/10, c'est une NP sévère.

En prenant la conduction nerveuse comme référence pour la détection de la NP, il a été démontré que le NSS avait une sensibilité de 82 % et une spécificité de 67 % (Asad et al., 2010).

- Le questionnaire **DN4 « Douleur Neuropathique en 4 Questions »** a permis d'évaluer les douleurs de type neuropathique grâce à 4 questions autour de 10 items pour lesquelles il faut répondre par « oui » ou par « non ». Chaque « oui » valide un point et si le score total est ≥ 4 , la présence d'une NP douloureuse est confirmée (Bouhassira et al., 2004). Ce questionnaire démontre une sensibilité de 80 % et une spécificité de 92 % (Spallone et al., 2012).
- Le **Monofilament Semmes-Weinstein 10g** a exploré la sensibilité superficielle. Il doit d'abord être appliqué sur le dos de la main pour que le patient sache ce qu'il doit ressentir. Le patient doit ensuite fermer les yeux et on applique le monofilament fermement, en une fois sur 3 zones de la face plantaire du pied (hallux, tête des 1^{er} et 5^{ème} métatarsien) sans ordre déterminé pour éviter les biais dus à l'anticipation du patient. Le patient doit répondre « oui » ou « non » instantanément après application du monofilament. L'application est répétée 10 fois de manière aléatoire sur les différents sites et le score total comptabilise le nombre de fois où le patient a ressenti la pression du monofilament (Gin and Rigalleau, 2002). Une méta-analyse de 2017 a démontré une sensibilité de 53 % et une spécificité de 88 % pour détecter la NP (Wang et al., 2017).
- Le « **NerveCheck** » (Phi Med Europe S.L., Barcelona, Spain) a mesuré de façon non-invasive la sensibilité proprioceptive à la vibration, la sensibilité thermique au froid et au chaud et le seuil de douleur thermique. Il a été validé contre le NDS (Ponirakis et al., 2016a) et se compose de 4 tests effectués les uns à la suite des autres.
 - × **Test 1** : La fonction sensitive proprioceptive (pallesthésie), véhiculée par les fibres myélinisées (A β), est quantifiée par le **seuil de perception vibratoire (VPT)**. Le stimulateur vibrant de l'appareil est placé sur l'hallux de manière à ce que toute sa surface soit en contact avec la peau (Figure 26). Quatre sortes de stimuli sont effectuées dans un ordre aléatoire (vibration forte, moyenne, faible, ou nulle-pas de stimulation) et le sujet doit dire si « oui » ou « non », il a perçu la vibration. Ce VPT démontre une sensibilité de 88 % et une spécificité de 82 % par rapport à la vitesse de conduction nerveuse pour détecter la NP (Ponirakis et al., 2016b). Sa reproductibilité est bonne avec un coefficient de corrélation de 0,79 (Ponirakis et al., 2016a).

- × **Test 2 :** Le **seuil de sensibilité au froid (CPT)**, véhiculé par les petites fibres myélinisées ($A\delta$), est testé sur le dessus du pied (Figure 26) grâce à 4 stimuli effectués de manière aléatoire (fort, moyen, faible, nul) allant de 10 à 23 °C. Le sujet doit dire si « oui » ou « non », il a perçu du froid. Ce CPT démontre une sensibilité de 53 % et une spécificité de 82 % par rapport à la densité de fibres intra épidermiques pour détecter la NP (Ponirakis et al., 2016b). Sa reproductibilité est bonne avec un coefficient de corrélation de 0,86 (Ponirakis et al., 2016a).
- × **Test 3 :** Le **seuil de sensibilité au chaud (WPT)**, véhiculé par les fibres amyéliniques (C), est mesuré de la même manière que le test au froid décrit précédemment pour des températures allant de 37 à 45 °C. Ce WPT démontre une sensibilité de 56 % et une spécificité de 81 % par rapport à la densité de fibres intra épidermiques pour détecter la NP (Ponirakis et al., 2016b). Sa reproductibilité est bonne avec un coefficient de corrélation de 0,71 (Ponirakis et al., 2016a).
- × **Test 4 :** Le **seuil de douleur thermique (HPT)** au chaud consiste en une augmentation progressive de la chaleur de 32 à 49 °C où le sujet doit dire « stop » quand la sensation devient gênante.

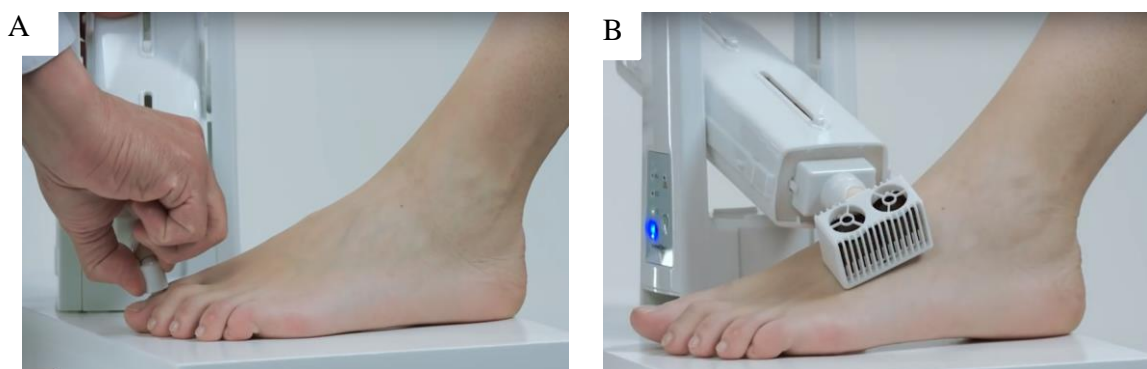


Figure 26 : Photo du NerveCheck pendant le test à la vibration (A) et les tests thermiques (B)

- Le « **DPNcheck** » (Neurometrix, Waltham, MA) a été utilisé pour la mesure de la conduction nerveuse. La vitesse et l'amplitude des potentiels au niveau du nerf sural sont mesurées. Les limites normales sont $\geq 5 \mu V$ pour l'amplitude et ≥ 41 m/s pour la vitesse. L'avantage de cet appareil est qu'il est accessible à des non spécialistes et a démontré une sensibilité de 82 % et une spécificité de 92 % par rapport à l'électrophysiologie standard avec une légère sous-estimation systématique des mesures (Perkins et al., 2006).

En résumé, la présence d'une NP a été établie dans l'étude **NEUROMICRO** avec un score composite (Tableau 9) créé à partir des outils utilisés et selon définitions du consensus de Toronto pour la recherche clinique (Tesfaye et al., 2010).

Tableau 9 : Construction du score composite utilisé dans l'étude NEUROMICRO selon la définition du consensus de Toronto

	Consensus Toronto	Score composite utilisé
NP confirmée	Symptômes ou signes AVEC Conduction nerveuse anormale	NSS ≥ 3 + DPN check : amplitude $< 5 \mu\text{V}$ et vélocité $< 41 \text{ m/s}$
	Symptômes ou signes AVEC Conduction nerveuse normale MAIS Atteintes petites fibres	NSS ≥ 3 + DPN check : amplitude $\geq 4 \mu\text{V}$ et vélocité $\geq 41 \text{ m/s}$ + Score nerve check anormaux (CPT < 3 ou WPT < 3 ou HPT non compris entre 35 °C et 47 °C).
NP infraclinique	Pas de symptômes ou signes AVEC Conduction nerveuse anormale	NSS < 3 + DPN check : amplitude $< 5 \mu\text{V}$ et vélocité $< 41 \text{ m/s}$
	Pas de symptômes ou signes AVEC Conduction nerveuse normale MAIS Atteintes petites fibres	NSS < 3 + DPN check : amplitude $\geq 4 \mu\text{V}$ et vélocité $\geq 41 \text{ m/s}$ + Score nerve check anormaux (CPT < 3 ou WPT < 3 ou HPT non compris entre 35 °C et 47 °C).

NP, neuropathie périphérique, NSS, Neuropathy Symptoms Score ; CPT, Cold Perception Threshold ; WPT, Warm Perception Threshold ; HPT, Heat Pain Threshold

Dans l'étude **PAIN**, la présence de douleur (critère d'inclusion) était validée par un score DN4 ≥ 4 . Les questionnaires NSS et DN4 mais aussi les tests de conduction nerveuse, de sensibilité (VPT, CPT, WPT) et les seuils de douleur thermique et mécanique ont été utilisés pour évaluer l'impact du traitement par champs magnétiques.

6. Détection des autres complications du diabète

a. La neuropathie autonome cardiaque

Etude NEUROMICRO

Chaque sujet a été équipé d'une montre Polar V800® synchronisée en Bluetooth avec une ceinture thoracique élastique Polar H10® (Polar Electro TM, Kempele, Finland). La détection de la NAC a été réalisée sur la base de 3 des 5 **Tests sur le Réflexe Autonome Cardiovasculaire proposés par Ewing** (Ewing et al., 1985) :

- **la réponse du rythme cardiaque à la respiration profonde** : ce test consiste à prendre six respirations profondes pendant 1 minute en position couchée (inspiration 5s - expiration 5s). Le résultat de ce test est un rapport expiration sur inspiration entre la fréquence cardiaque minimale moyenne des six expirations sur la fréquence cardiaque maximale moyenne des six inspirations. Pour sa réalisation, l'application smartphone RespiRelax® (Thermes d'Allevard, Isère, France) a été utilisée.
- **le test orthostatique pour la réponse du rythme cardiaque et de la pression artérielle au changement de posture allongée-debout** permet de rechercher une hypotension orthostatique. Celle-ci est caractérisée par une chute de la tension artérielle systolique d'au moins 20 mmHg et/ou de la diastolique d'au moins 10 mmHg à 1 minute, 3 minutes et 5 minutes après le lever du patient. Ce test permet également d'évaluer l'évolution de la FC lors de ce changement de position entre le 15^{ème} et 30^{ème} battement cardiaque.

Chaque test s'est vu affecter un score de 0 pour une réponse normale, 0,5 pour une réponse borderline et 1 pour une réponse anormale. La présence d'une NAC a été établie à partir du moment où le score total des 3 tests était supérieur à 1.

Il a été démontré une diminution des performances au test de respiration profonde avec l'âge qui pourrait donner lieu à l'adaptation des ratio notamment, sur le rapport expirations sur inspirations en fonction de l'âge des patients (Smith, 1982; Ziegler et al., 1992). Cependant, pour simplifier le diagnostic, les études les plus récentes ne prennent pas des critères différents selon l'âge des patients (Stranieri et al., 2013).

b. La rétinopathie

Etude NEUROMICRO

La détection de la rétinopathie a été faite grâce aux résultats de l'examen du fond d'œil réalisé par les ophtalmologues du centre hospitalier d'Avignon. Cet examen consiste à observer la rétine et ses vaisseaux, la papille optique (tête du nerf optique) et la macula après dilatation pupillaire. Il permet d'observer les atteintes vasculaires (micro-anévrismes, ischémies), les décollements de la rétine ou la présence de glaucome.

c. La néphropathie

Etude NEUROMICRO

La détection de la néphropathie s'est basée sur le calcul du DFG selon la formule de CKD-EPI (Levey et al, 2009) :

$$DFG \text{ (mL/min/1,73 m}^2\text{)} = 141 \times \min(\text{Scr}/k, 1)^\alpha \times \max(\text{Scr}/k, 1)^{-1.209} \times 0,993^{\text{Age}} \times 1,018 \text{ [si femme]} \times 1,159 \text{ [si de couleur noir]}$$

Où : *Scr* = Créatinine sérique en $\mu\text{mol/L}$

min = minimum de *Scr/k* ou 1

max = maximum de *Scr/k* ou 1

k = 61.9 (femmes) ou 79.6 (hommes)

α = -0.329 (femmes) or -0.411 (hommes)

Sur la base de ce calcul, un DFG < 90 mL/min/1.73 m² attestait de la présence d'une néphropathie conformément aux recommandations de la haute autorité de santé (Rapport, 2002).

d. L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs

Etude NEUROMICRO et PAIN

La présence d'AOMI a été évaluée grâce au Toe-Brachial Index (TBI), c'est à dire le rapport de pression artérielle mesurée à l'orteil et au bras. Le tensiomètre Omron HEM-907 (Omron Healthcare Co. Ltd) a été utilisé pour prendre la mesure au niveau du bras.

La pression à l'orteil a été mesurée au niveau de l'hallux par photopléthysmographie grâce à l'appareil Systoe (Atys Medical, Soucieu-en-Jarrest, France), un TBI $\leq 0,7$ indiquant la présence d'une AOMI (Høyer et al., 2013).

7. Evaluation de la qualité de vie et du niveau d'activité physique

Etude NEUROMICRO

Il a été démontré que le diabète et ses complications comme la neuropathie ont un impact important sur la **qualité de vie** et la dépression (Sharif et al., 2019). La qualité de vie a été quantifiée grâce à l'auto-questionnaire **EQVOD** (Echelle de Qualité de Vie Obésité et diététique) validé en français et adapté aux facteurs socio-culturels de l'obésité-diabète en France. Il permet de prendre en compte les effets des traitements sur la qualité de vie des sujets obèses (Ziegler et al., 2005). Il comporte 36 items, cotés de 1 (toujours/énormément) à 5 (jamais/pas du tout) et explore cinq dimensions (physique, psychosocial, vie sexuelle, bien-être alimentaire et vécu du régime).

La cotation de chaque dimension est rapportée à 100 et plus le score est proche de 100, meilleure est la qualité de vie en lien avec cette dimension.

Le **niveau d'activité physique** est aussi diminué chez les DT2 (Tudor-Locke et al., 2002) et d'autant plus, lorsqu'il y a des complications microvasculaires associées (Janevic et al., 2013). Le niveau d'activité physique habituel a été évalué par le questionnaire **IPAQ** (International Physical Activity Questionnaire). Il consiste en un rappel de l'activité physique sur les 7 derniers jours. Il est validé en français et chez les patients diabétiques (Crinière et al., 2011). Il comporte 4 items sur les activités physiques intenses/sportives, de loisirs, la marche à pied et le temps passé assis. Les paramètres de fréquence et durée sont pris en compte. Le calcul des scores a été fait grâce à une macro Excel développée par ML Erpelding (<https://sites.google.com/site/theipaq/scoring-protocol>). En fonction des scores, les sujets sont classés en 3 niveaux d'activités physiques : léger, modéré ou élevé.

L'activité physique a également été appréciée à l'aide d'un **podomètre** (Omron Walking Style One 2.1, Omron Healthcare Co. Ltd). Les patients devaient le porter à leur sortie d'hospitalisation pendant 4 jours consécutifs et noter le nombre de pas effectués chaque jour.

8. Evaluation de la douleur

Etude PAIN

La douleur a été mesurée de manière classique par l'échelle visuelle analogique (**EVA**) allant de 0 (absence de douleur) à 10 (douleur maximale imaginable). L'EVA se présente sous la forme d'une réglette de 10 cm graduée en mm présentée au patient qui doit positionner le curseur à l'endroit qui situe le mieux sa douleur.

Cette échelle étant très subjective et globale, le questionnaire **Brief Pain Inventory (BPI)** validé chez le diabétique (Zelman et al., 2005) a été ajouté. Il évalue la douleur sur les 7 derniers jours et comprend 4 questions sur la douleur générale, 2 questions sur les traitements utilisés et

7 questions sur le retentissement de la douleur sur l'activité générale, le sommeil, les relations sociales, l'humeur, le goût de vivre, la marche et le travail habituel.

Le seuil de **douleur thermique** a été déterminé grâce au **test HPT du Nerve Check** et la **douleur mécanique** à la pression a été mesurée grâce à un algésimètre **Von Frey électronique** (BIO-EVF4, Bioseb, Vitrolles, France). C'est un dispositif pratique qui cause peu d'inconfort (Chassaing et al., 2006). Le test consiste en une application progressive et constante d'une pointe en plastique dure mesurant la pression appliquée (g) sous la plante du pied (Figure 27).

Le seuil de douleur mécanique est considéré comme la plus petite pression produisant une sensation



Figure 27 : Von Frey électronique (BIO-EVF4, Bioseb, Vitrolles, France)

douloureuse. Le test était répété deux fois et la moyenne des deux résultats a été calculée.

9. Evaluation de la microcirculation

Dans **toutes les études**, la microcirculation a été enregistrée par LDF et pour les études **NEUROMICRO** et **PAIN**, le **LSCI** a été ajouté.

a. Principe de fonctionnement LDF

Etude FLOWMOTION, NEUROMICRO et PAIN

Le principe de fonctionnement du LDF (Periflux LDF-500 Perimed, Suède) consiste en la production d'un faisceau lumineux par laser (Light Activation by Stimulated Emission Radiation) à gaz hélium-néon (He-Ne) ou par diode laser qui pénètre la peau à une profondeur d'environ 1 à 1,5 mm. Les fibres optiques, contenues dans la sonde collée sur la peau, conduisent le faisceau à une longueur d'ondes de 0,7 μm ce qui est inférieur à la taille des globules rouges (7-8 μm). Ce

faisceau interagit avec les structures fixes de la peau et mouvantes de la circulation sanguine : les globules rouges. Le signal reflété se compose donc de deux parties (Figure 28) :

- la partie reflétée par les tissus stables qui conserve la même fréquence que le signal émis,
- la partie reflétée par les globules rouges en mouvement avec un décalage de fréquence. Ce décalage de fréquence est appelé « Effet doppler ».

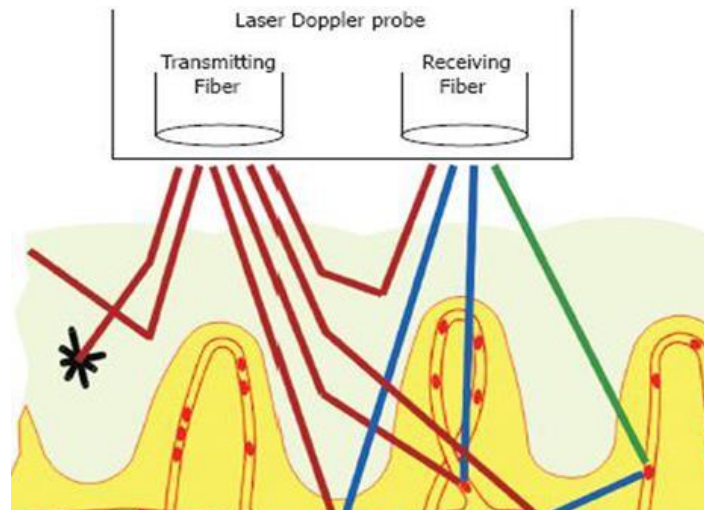


Figure 28 : Principe de fonctionnement du LDF (Hoff et al., 2009)

La vitesse de déplacement des globules rouges dans la zone du faisceau provoque le décalage de fréquence déterminé par l'angle de réflexion, proportionnel à la vitesse des particules et inversement proportionnel à la longueur d'onde du signal. Mais ceci ne permet pas de quantifier précisément le nombre et la vitesse des globules rouges d'où l'appellation Fluxmètre (mesure du flux). Le LDF donne une succession de valeurs exprimées en unités de perfusion (PU) et calculées par le produit de la vitesse et de la concentration des globules rouges dans le volume mesuré (Martini and Bagno, 2018). Pour prendre en compte les différences de pression artérielle inter-groupes ou entre les tests, Roustit and Cracowski recommandent l'expression en valeurs de conductance vasculaire cutanée (CVC), calculées en divisant les PU par la pression artérielle moyenne (mmHg) (Roustit and Cracowski, 2013).

L'inconvénient de cette technique est sa zone restreinte de mesure (environ 1 mm^3) et la variabilité de répartition des vaisseaux sanguins cutanés (Roustit and Cracowski, 2013). Les avantages de cette technique sont une mesure non-invasive du flux sanguin cutané et sa sensibilité à détecter des changements lors de l'application d'un stimulus. Son atout majeur est sa grande résolution temporelle et sa fréquence d'acquisition à 32 Hz qui permet de faire une analyse spectrale du signal en distinguant les différents mécanismes de contrôle du débit sanguin.

La reproductibilité des signaux LDF est faible au repos (coefficient de variation 25 – 35 %) due à la variabilité spatiale des vaisseaux (Tew et al., 2011). Cette reproductibilité varie en fonction du type de stimulus réalisé. Elle est faible pour l'hyperhémie post-occlusive (PORH) et le LTH, le coefficient de variation est respectivement de 30 et 42 % (Roustit et al., 2010b). Cela dit, en fixant la température des sondes à 32 °C pendant les enregistrements au repos, on améliore cette reproductibilité sur le PORH (Roustit et al., 2010a; Agarwal et al., 2010).

Roustit et al. ont quand même démontré une bonne reproductibilité à 7 jours sur un test de vasoconstriction au froid (15 °C) pendant 30 minutes avec un coefficient de variation de 8 % (Roustit et al., 2010c). Il semble préférable que les valeurs soient exprimées en %_{Baseline}, %_{Peak} ou en CVC pour avoir la meilleure reproductibilité possible (Roustit and Cracowski, 2013).

b. Principe de fonctionnement LSCI

Étude NEUROMICRO et PAIN

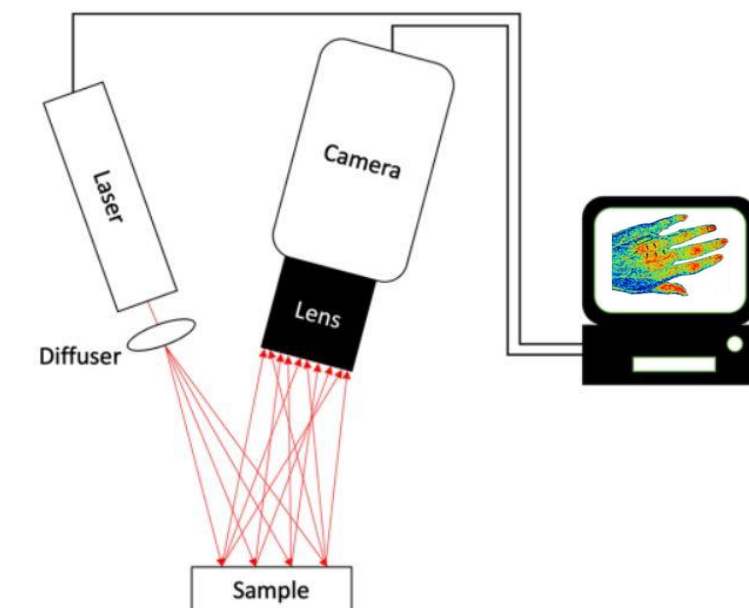


Figure 29 : Principe de fonctionnement du LSCI (Perimed)

Le LSCI (PeriCam, Perimed, Suède) utilise l'émission d'un laser à distance sans contact avec la peau qui est projeté sur la surface de la peau. La lumière rétrodiffusée par un objet forme un motif d'interférence aléatoire constitué de zones de contrastes (Figure 29). C'est la technique d'analyse du contraste de granularité laser appelée Speckle. Lorsque l'objet est en mouvement, par exemple les globules rouges, la figure de granularité présente des modifications dans le temps en fonction de ces mouvements. Dans le système PeriCam, une caméra CCD (Charge Coupled Device) enregistre les variations de contraste de la figure de granularité et permet de visualiser la perfusion sanguine tissulaire, en temps réel, mesurée en PU. Après calibration à l'aide d'une suspension de billes de latex, le système acquiert des images et les analyse pour restituer des images 2D traduisant la perfusion cutanée selon un code couleur entre 0 et 300 PU (0-50 PU noir, 50-100 PU bleu foncé, 100-130 PU vert, 130-170 PU jaune, et >200 PU rouge). La profondeur de pénétration du faisceau est d'environ 300 à 600 μm selon le tissu (O'Doherty et al., 2009), c'est à dire que la perfusion est mesurée au niveau des boucles capillaires du plexus superficiel.

L'avantage de cette technique est la possibilité de mesure sur un grand espace (jusqu'à 100 cm²) ce qui lui confère une meilleure reproductibilité (Roustit et al., 2010a) mais avec une résolution temporelle plus faible (moyenne PU sur quelques images/secondes) que le LDF (Roustit and Cracowski, 2013). En effet, le pic PORH et le plateau LTH démontrent une meilleure reproductibilité avec le LSCI par rapport au LDF, respectivement 8 % vs 30 % et 15 % vs 42 % (Roustit et al., 2010a). Cette technique est aussi très sensible aux artefacts de mouvement, qui peuvent être diminués par du port-processing (Mahe et al., 2013). Afin de les réduire au minimum, dans nos études, le pied a été positionné sur un coussin à vide.

Pour conclure, l'intérêt d'utiliser les deux techniques vient du fait que le LSCI avec sa grande aire de mesure permet d'ajuster la région analysée précisément alors que le LDF est concentré sur un point. Cependant, cette mesure en un point avec des fréquences d'acquisition élevées permet une analyse spectrale du signal essentielle dans la compréhension des mécanismes régulant le flux sanguin. Ce type d'analyse commence à être étudié avec le LSCI (Humeau-Heurtier et al., 2013; Mizeva et al., 2019). Enfin, les profondeurs d'acquisition des lasers sont différentes donnant donc des valeurs de PU différentes pour une même mesure (Hodges et al., 2019a). Le LSCI estime le flux sanguin nutritif au niveau des boucles capillaires alors que le LDF permet d'observer le flux plus profondément au niveau des AVAs. Le couplage de ces deux techniques de mesure permet de pallier les désavantages d'une technique par rapport à l'autre et d'étudier le plexus vasculaire superficiel dans sa globalité.

c. Enregistrement et traitement des données

Etude FLOWMOTION

Le traitement des données de perfusion au repos en position allongée a été fait uniquement en décomposition en ondelette permettant l'analyse spectrale. Cependant, la détection des outliers a été faite sur les signaux temporels de perfusion par identification des artefacts selon la déviation absolue à la médiane (MAD). Cette technique nous a permis d'identifier par le calcul, les sujets dont le signal n'était pas assez stable pour l'analyse flowmotion. Ainsi, nous avons déterminé les points du signal temporel ayant une valeur d'au moins 3 fois la MAD et ensuite considéré leur amplitude et leur nombre sur le signal total. Enfin, ont été exclus les sujets qui s'écartaient de la médiane du groupe \pm deux interquartiles sur l'un ou l'autre de ces deux paramètres. L'identification des outliers est donc ici basée seulement sur des calculs et est ainsi indépendante de l'opérateur.

Etude NEUROMICRO

Pour cette étude, différentes variables ont été définies selon les stimuli :

Au repos (LDF-LSCI)

- Le PU_{REPOS} correspond à la moyenne des perfusions sur les 2 minutes les plus stables de l'enregistrement total au repos.

Pendant la déclivité (LDF)

- Les PU moyens sur 30 secondes ont été calculés sur les deux premières minutes de déclivité ainsi que les PU moyens par minute sur les 3 minutes suivantes (VAR_{30} , VAR_1 , $VAR_{1,30}$, VAR_2 , VAR_3 , VAR_4 et VAR_5). Ils ont été exprimés en perfusion et en pourcentage du PU_{REPOS} .
- L'aire sous la courbe basée sur ces points a été calculée.
- La perfusion minimale (VAR_{MIN}) a été identifiée et calculée en pourcentage de réduction par rapport au PU_{REPOS} ($VAR_{MIN\%}$).
- Le temps pour atteindre VAR_{MIN} a été identifié.

Pendant la récupération post-exercice (LDF-LSCI)

- Les données de perfusion ont été moyennées sur chaque minute pendant les 10 minutes de récupération (R_1 à R_{10}) et exprimées en perfusion et en pourcentage du PU_{REPOS} .
- L'aire sous la courbe basée sur ces points a été calculée.

Pendant l'hyperhémie thermique locale (LDF)

- Un $PU_{BASELINE}$ a été obtenu en prenant la moyenne sur 20 secondes juste avant le chauffage des sondes.
- Le PU_{Pic} correspond à la moyenne sur 20 secondes pendant le pic axonal facilement identifiable sur les enregistrements LDF.
- Le $PU_{Plateau}$ a été obtenu en faisant la moyenne sur 2 minutes entre les deux dernières minutes du LTH (T_{13min} et T_{15min}).
- Les données PU_{Pic} et $PU_{Plateau}$ ont aussi été calculées en pourcentage du $PU_{BASELINE}$.

Lorsque cela était possible, les données ont été exprimées en CVC mais ce n'est pas toujours le cas car la pression artérielle n'était pas prise en continu pendant le protocole mais seulement, avant et après chaque stimulus.

Etude PAIN

A ce stade et en attendant l'inclusion de tous les patients dans l'étude, les données microcirculatoires (LDF et LSCI) ont été moyennées sur la période de 6 minutes au repos et de 6 minutes d'application des appareils. Dans ce protocole, en plus des perfusions LDF, nous avons analysé la vélocité, la concentration et la température cutanée mesurées par la sonde LDF. Toutes ces données sont exprimées en perfusion et en pourcentage du repos.

10. Analyse spectrale

Etude FLOWMOTION et NEUROMICRO

a. Traitement du signal

Le signal microcirculatoire enregistré est couramment représenté dans le temps. Mais la haute fréquence d'acquisition du LDF permet d'appliquer une transformation mathématique afin d'observer les informations pertinentes contenues dans le domaine spectral.

Dans un premier temps, la méthode de Transformée de Fourier (FT) a été la plus utilisée. Sa théorie est basée sur le fait que « Toute fonction périodique peut être exprimée en une somme de sinus et cosinus. » donc, qu'un signal peut se décomposer en une somme de signaux sinusoïdaux à différentes fréquences. Mais cette méthode présente quelques limites. En effet, la décomposition d'un signal se fait en une somme de signaux sinusoïdaux ayant la même durée. Quand le signal est stationnaire ou oscille à une fréquence constante, ça ne pose pas de problème mais lorsque ce n'est pas le cas, comme pour les signaux microcirculatoires, il faut pouvoir ajuster cette durée du signal sinusoïdal. La STFT (Short-term Fourier Transform) a justement été créée pour les signaux non-stationnaires permettant de diviser le signal en petites parties et d'analyser séparément chaque partie. Le problème, c'est que la durée de la fenêtre d'analyse est fixe et qu'il est peu probable que la même fenêtre soit adaptée à chaque partie du signal microcirculatoire. La FT ou la STFT donnent donc une idée du signal dans les valeurs de fréquence mais ne sont pas assez précises pour l'analyse du signal microcirculatoire qui n'est pas stationnaire dû à sa nature dynamique.

La méthode d'analyse en ondelettes (Wavelet Analysis) et plus précisément, des ondelettes de Morlet (Morlet, 1983), est aujourd'hui la plus utilisée. Dans cette technique, la décomposition en une somme de fonctions sinusoïdales est remplacée par une décomposition en une somme d'ondelettes.

Cette méthode permet d'ajuster très finement la durée des fenêtres d'analyse et d'utiliser la plus adaptée pour chaque point dans le plan temps-fréquence et localiser l'évènement pour choisir dans quel plan la valeur est la meilleure. Les ondelettes de Morlet offrent une localisation temps-fréquence optimale pour le signal de perfusion sanguine par rapport aux Transformées de Fourier (Figure 30). De plus, cette méthode présente une bonne reproductibilité sur des enregistrements au repos (Jan et al., 2005).

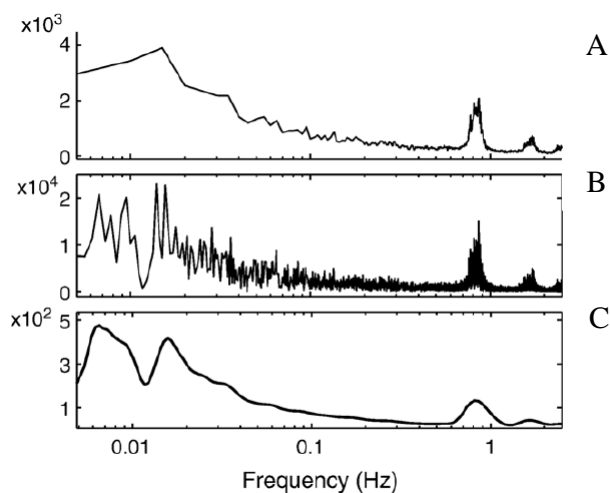


Figure 30 : Traitement d'un signal microcirculatoire au repos : en Transformée de Fourier (A), en Short Term Fourier Transform (B) et en ondelettes de Morlet (C) (Kvandal et al., 2006)

Grâce à cette analyse en ondelettes, on peut donc construire le spectre du signal en temps-fréquence (Figure 31a) ou en terme de moyenne temporelle 2D (Figure 31b). Sur les spectres de la figure 31, on note la présence de pics dans certaines bandes de fréquences. Ceux-ci ont été découverts et décrits par Stefanovska et son équipe en 1998 (Bracic and Stefanovska, 1998). Ces pics correspondent à des mécanismes spécifiques de régulation de la circulation sanguine que nous avons présentés dans la revue de littérature.

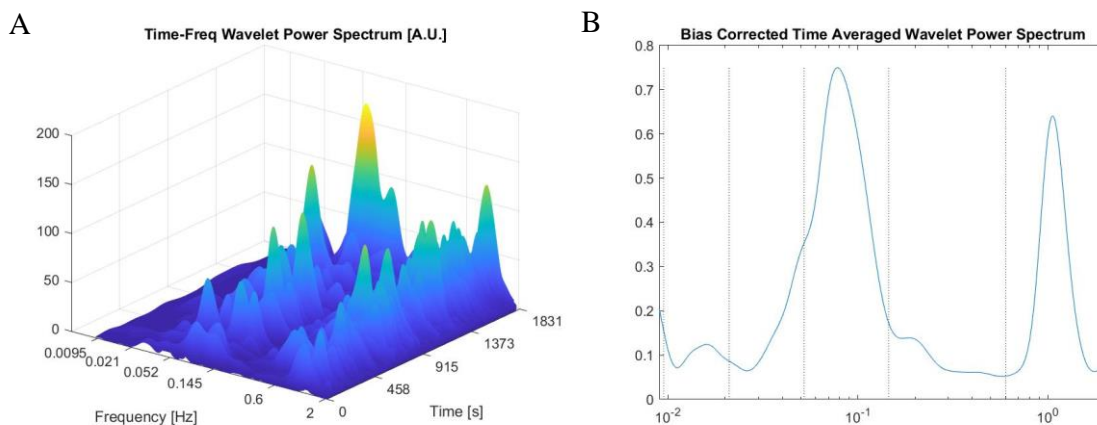


Figure 31 : Spectre de puissance d'un signal de perfusion au repos : représentation Temps-Fréquence (A) et représentation 2D par moyenne temporelle du spectre (B)

La reproductibilité de l'analyse en ondelettes a été démontrée comme bonne voire excellente, chez des sujets jeunes sains avec des coefficients de variation au repos compris entre 21 et 24 %, pendant le LTH entre 17 et 22 % et pour le pic de PORH, entre 14 et 23 % (Hodges et al., 2019b).

b. Analyse des données

Etude FLOWMOTION

L'analyse fréquentielle des enregistrements a été générée sur le signal complet de 20 minutes qui servait de référence et sur le même enregistrement tronqué d'une minute à la fin jusqu'à atteindre un enregistrement de 10 minutes. A chaque fois, le spectre total a été découpé en 5 bandes de fréquence définies par Stefanovska et Bracic (Bracic and Stefanovska, 1998) et l'amplitude moyenne du spectre, dans chacune des bandes, a été calculée. Celles-ci ont été exprimées en valeurs relatives, c'est-à-dire en pourcentage de l'amplitude moyenne du spectre total et non en valeurs absolues puisque les enregistrements étaient de durées différentes.

Etude NEUROMICRO

L'analyse spectrale a été faite sur le signal total puis les périodes de repos (15 min), du VAR (6 min), de la récupération post-TM6 (10 min) et de l'hyperhémie thermique locale (15 min) ont été exportées. Pour chacun de ces enregistrements, l'amplitude médiane du spectre total, les amplitudes médianes absolues au sein de chaque bande de fréquence ont été calculées.

Celles-ci ont aussi été exprimées en pourcentage du spectre total pour s'affranchir des changements de spectre entre les groupes et entre les différents stimuli. Dans cette analyse, nous avons choisi d'analyser 6 bandes de fréquence comme préconisé par Kvandal et al. (Kvandal et al., 2006).

11. Statistiques

Etude FLOWMOTION

Les statistiques ont été réalisées sur le logiciel MedCalc (MedCalc, V19.0.5–64bit, Ostend, Belgium). Le but était de comparer les analyses spectrales des trois basses fréquences des enregistrements tronqués avec l'enregistrement de référence de 20 minutes. Les données n'étant pas normalement distribuées, des tests non paramétriques de Wilcoxon ont été réalisés. Le coefficient de Spearman a permis de mesurer les corrélations entre les bandes des enregistrements tronqués et du signal de référence. Enfin, la régression de Passing-Bablok (Passing and Bablok, 1983) a été utilisée pour comparer de manière robuste sur la base de 3 critères (différence systématique, différence proportionnelle et test de linéarité) les enregistrements tronqués et l'enregistrement de référence.

Etude NEUROMICRO

Les statistiques ont été réalisées sur le logiciel SPSS (IBM SPSS statistics 20.0™ software, IBM Corp., USA). Un test du Khi-deux a été réalisé pour vérifier la répartition homme/femme, le nombre de traitements médicamenteux et le nombre de complications entre les groupes. Des modèles linéaires généralisés (GLM) univariés ont été utilisés pour comparer les groupes entre eux. Des GLM mixtes ont permis d'évaluer l'évolution au cours du temps des données de perfusion pendant la déclivité et pendant la récupération post-TM6 en fonction des groupes. Lorsqu'une interaction groupe \times temps était significative, des tests post-hoc de Bonferroni ont été utilisés.

Selon les résultats des matrices de corrélation, des covariables telles que l'âge, le sexe, le PU_{REPOS} , la température cutanée et la distance de marche ont été ajoutées au modèle.

Etude PAIN

Les statistiques ont été réalisées sur le logiciel SPSS (IBM SPSS statistics 20.0™ software, IBM Corp., USA). Ces statistiques ont été réalisées à titre indicatif pour la présentation de cette étude dans la thèse, mais le recrutement de patients est encore en cours.

L'effet aigu des séances de champs magnétiques a été étudié par des ANOVA à mesures répétées à trois facteurs pour analyser l'effet de l'appareil (2 niveaux : actif et placebo), le jour (2 niveaux : JOUR 1 et JOUR 15), la condition (2 niveaux : repos et dispositif en fonctionnement) et leur interaction sur la perfusion (LDF et LSCI), la vitesse, la concentration et la température cutanée. Les niveaux de condition étaient PRE et POST (session champs magnétiques) pour la douleur EVA et les seuils de douleur thermique et mécanique. Des tests post-hoc ont été réalisés pour identifier les différences entre les variables lorsque les interactions : appareil \times condition, appareil \times jour ou appareil \times jour \times condition étaient significatifs. Sinon, seuls des effets simples ont été signalés.

Des ANOVA à mesures répétées à deux facteurs ont été effectuées pour analyser l'effet chronique du traitement sur les seuils sensitifs, la conduction nerveuse et les niveaux de douleur et de microcirculation au repos au jour 1 et au jour 15.

Enfin, des tests T de Student appariés ont été effectués pour comparer le score des questionnaires au jour 1 et au jour 15.

Quelle que soit l'étude, les différences statistiques ont été considérées comme significatives quand la valeur de p était $<0,05$.

Partie 3. Etudes réalisées

- **Etude 1: Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining Wavelet Analysis quality: A methodological study.**

Published in *Microvascular Research*, 2020

- **Etude 2: Concomitant peripheral neuropathy and type 2 diabetes impairs post-exercise cutaneous perfusion and flowmotion.**

En cours de révision in Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2021

- **Etude 3: Mechanisms of venoarteriolar reflex during foot lowering in type 2 diabetes with or without peripheral neuropathy.**

En cours de révision in Microcirculation in Health and Disease, special issue of *Biology (MDPI)*, 2021

- **Etude 4: Analgesic effect of time varying magnetic field device therapy on painful diabetic neuropathy: preliminary results of a double blind randomized controlled study.**

Etude en cours



1. Étude 1:

Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining Wavelet Analysis quality: A methodological study.

Quelles durées d'enregistrement de LDF optimales pour une analyse spectrale en ondelettes fiable : Etude méthodologique

Microvascular Research 131 (2020) 104034

Contents lists available at [ScienceDirect](#)


 **Microvascular Research** 

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

Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining wavelet analysis quality: A methodological study

C. Reynès, A. Vinet, O. Maltinti, Y. Knapp*

Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000 Avignon, France



Résumé de l'étude 1

Le LDF est largement utilisé pour étudier la microcirculation de par sa technique non-invasive. Avec sa haute résolution temporelle, il permet d'explorer les mécanismes de contrôle du flux sanguin cutané. Les bandes de fréquence [0.0095–0.02 Hz] ; [0.02–0.06 Hz] ; [0.06–0.15 Hz] ; [0.15–0.4 Hz] ; [0.4–1.6 Hz] ont été démontrées comme représentatives des mécanismes de contrôle endothéliaux, neurogénique, myogénique, respiratoire et cardiaque respectivement. Cependant, aucune recommandation n'a été définie sur la durée minimale d'enregistrement du signal LDF permettant une analyse spectrale fiable. De manière générale, les auteurs respectent une durée d'au moins 20 minutes mais ce temps requérant d'être parfaitement immobile est parfois difficile à respecter dans certaines populations (enfants, sujets avec des douleurs...).

Ainsi, l'objectif de cette étude était de définir le temps d'enregistrement minimal pour faire une décomposition en ondelettes fiable chez des sujets sains.

Soixante-cinq participants sains (34 hommes et 31 femmes) ont été inclus. Des enregistrements du flux sanguin cutané, pendant 20 minutes, en position allongée au repos, au niveau de l'avant-bras et de la partie dorsale du pied, ont été réalisés. Les enregistrements ont été tronqués de leur dernière minute jusqu'à atteindre un enregistrement de 10 minutes, puis la décomposition en ondelettes de Morlet a été effectuée. La régression de Passing-Bablok a été utilisée pour comparer les bandes basses fréquences des différentes durées d'enregistrement par rapport à l'enregistrement de référence (20 minutes). Cette technique permet d'estimer la qualité de l'enregistrement selon 3 critères : les différences systématiques, les différences proportionnelles et la linéarité entre les deux enregistrements.

Nos résultats ont démontré que des enregistrements d'au moins 10 minutes étaient nécessaires pour l'analyse de la bande myogénique, quel que soit le site anatomique. Sur l'avant-bras, la durée des enregistrements LDF devait être d'au moins 15 minutes et 10 minutes pour les bandes neurogénique et endothéliale, respectivement. Sur le pied, 13 minutes d'enregistrement LDF étaient nécessaires pour évaluer ces deux bandes.

Ainsi, la durée des enregistrements LDF doit être d'au moins 15 minutes sur l'avant-bras et 13 minutes sur le pied pour maintenir une analyse spectrale de qualité sur les bandes basses fréquences.



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

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

Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining wavelet analysis quality: A methodological study

C. Reynès, A. Vinet, O. Maltinti, Y. Knapp*

Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000 Avignon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Basal skin blood flow
Laser Doppler flowmeter
Flowmotion
Wavelet analysis
Passing-bablok regression

ABSTRACT

Recording oscillations in cutaneous blood perfusion using laser Doppler flowmetry (LDF) is of common use in clinical research, due, mainly, to its non-invasive nature. Detailed information about the vascular tone in different frequency bands and the related physiologic compartment can be inferred from wavelet analysis (WA) of an LDF signal. However, little is known about the minimal recording duration required to generate a proper representation of the frequency content of such signals. To address this question, the three lowest frequency bands (i.e. myogenic, neurogenic and endothelial) of the LDF wavelet power spectrum were studied to define the shortest recording duration needed to perform a quality WA. Sixty-five healthy participants were included for 20 min of basal LDF recording on forearm and dorsum of the foot. Recordings were short cut every minute and compared to the 20-min reference recording that is generally used in the literature.

Our results indicate that minimum 10 min recordings are required for analysis of myogenic events, whatever the anatomical site. On the forearm, LDF recordings lengths should be at least 15 min and 10 min for the neurogenic and endothelial bands, respectively. On the foot, 13 min of LDF recording is required to assess neurogenic and endothelial bands.

Depending on the aim of any given study involving healthy subjects, LDF recordings need to last at least 15 min on forearm and 13 min on the foot to maintain a quality WA on low-frequency bands.

1. Introduction

The microcirculation is integral in the maintenance of optimal blood pressure throughout the entire vascular network and to the regulation of blood distribution throughout the nutritive microvascular network, where blood to tissue nutrient and waste exchange occurs. The microcirculation of the skin has become widely accepted as a strong representation of systemic microcirculation, due, in-large, to the non-invasive nature in which it can be monitored (Holowatz et al., 2008). Laser Doppler Flowmetry (LDF) has been one of the most commonly used non-invasive technologies in studies of the microcirculation, providing continuous measurement of cutaneous microvascular blood perfusion. Performed directly on the patient's skin, this semi-quantitative technique delivers high temporal resolution, allowing researchers to study the periodic oscillations in cutaneous blood perfusion, the so-called flowmotion, which is a consequence of the rhythmic tone changes in blood vessels. Spectral analysis of the skin laser Doppler signal enables for the identification of five frequency peaks that are observed within five different frequency bands, each associated with a different physiological event. These physiological events include

extrinsic or central mechanisms, such as cardiac (1.6 Hz–0.4 Hz) and respiratory rhythms (0.4 Hz–0.15 Hz), and intrinsic or local mechanisms, such as myogenic (0.15–0.06 Hz), neurogenic (0.06–0.02 Hz) and endothelial regulation (0.02–0.0095 Hz) (Kvandal et al., 2006; Stefanovska et al., 1999). The relationships between these frequency bands and their corresponding physiological events have been assessed using Wavelet Analysis, which allows each event to be distinguished from one another (Martini and Bagno, 2018). Implemented in many clinical trials, this technique, in association with different protocols and post-processing methods, permits for early and easy detection of impaired cutaneous microvascular function, as well as providing a method for evaluating the mechanisms underlying haemodynamic properties of blood flow (Sun et al., 2013; Rossi et al., 2006).

The main drawback of LDF is the constraint of mandatory immobility during assessments. Indeed, most studies record cutaneous blood perfusion for at least 20 min (Martini and Bagno, 2018); to “ensure resting conditions of the subject and weak stationarity” (Stefanovska et al., 1999). Such a constraint can be difficult to manage depending on the population being assessed and the anatomical location of the measurement. Shorter assessments may, therefore, be

* Corresponding author at: Avignon Université, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, F-84000 Avignon, France.
E-mail address: Yannick.knapp@univ-avignon.fr (Y. Knapp).

superior by obviating artefacts that can be caused by prolonged immobility. From a basic signal processing point of view, the lowest frequency, 0.0095 Hz, has a periodicity of 105 s. Therefore, 2-min of LDF recording should be long enough to allow for a low frequency band, such as that, to be detected. However, such simplistic rationale is not applicable in this instance since biological signals, periodic by nature, also follow variations in their amplitude; where signals that are prominent in one moment become difficult to detect in another moment. To account for this, a classic rule of a thumb is to record for at least 10 periodic oscillations in the frequency band of interest. While this rule can easily be applied when completing assessments in resting conditions, it cannot be reasonably applied when there are larger variations in cutaneous perfusion. Considering this as a whole, there is a need to determine a balance between short (e.g. 2 min) and long (e.g. 20 min) LDF recordings.

One of the rare publications providing recommendations on minimal recording time in clinical studies links to heart rate variability (HRV). Indeed, it recommends “at least 10 times the wavelength of the lower frequency bound of the investigated component.” (Heart Rate Variability Task Force report, 1996). Applying such a recommendation here would imply that an LDF recording should be at least 17min30s in duration (lowest frequency 0.0095 Hz with periodicity of 105 s). However, most of the literature that has utilized LDF has recorded cutaneous blood perfusion for a period of 20 min.

Given that there is currently no clear justification or guidelines for the optimal duration of LDF recordings, this study aimed to compare the frequency spectrum of low-frequency oscillations in cutaneous blood perfusion between a 20-minute segment of LDF recording (considered as the reference recording duration) and short-cut signals in healthy participants, on the forearm and the dorsum of the foot. Indeed, these comparisons have the potential to define what is the optimal duration for an LDF recording that will allow researchers to capture sufficient low-frequency resolution along with oscillations in the low frequency bands, while minimizing demands of a research protocol on the participants.

2. Material and methods

2.1. Study protocol

2.1.1. Participant recruitment

After providing written informed consent, 65 healthy, non-smoking individuals (34 men and 31 women with mean [SD] age of 34 [12.6] years) were included. Participants were eligible if they were aged between 20 and 60 years, were free of cardiovascular or endocrine diseases, and were not using any current medications. Participants were recruited from the community and via advertisement on a public notice board. This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines.

2.1.2. Cutaneous microvascular assessments

Microvascular assessments were performed in a quiet, temperature-controlled room (22–24 °C) after participants rested in a supine position for 20 min. Indeed, all participants remained in a supine position throughout the microvascular assessment. Participants were instructed to present to the laboratory at least 2 h fasted and to abstain from caffeine and strenuous exercise in the 24 h prior to their assessment. Cutaneous microvascular perfusion was assessed using an LDF system (Periflux 5000, Perimed, Sweden) coupled with two thermostatic LDF probes with a wavelength of 780 nm and an effective surface of 0.95 cm² (PF 481, Perimed, Stockholm, Sweden). An LDF probe emits and detects light partially backscattered in the tissues by moving blood cells, causing a change in frequency. According to the Doppler principle, the proportion of non-shifted to shifted light is related to the number of moving cells and the velocity of these cells is a characteristic of tissue perfusion. Laser Doppler measurements were recorded

continuously at frequency of 32 Hz using an interfaced computer with data acquisition software (Perisoft, Perimed, Järfälla, Sweden). Calibration of the LDF system was performed using colloidal latex particles, the Brownian motion of which provided the standardized perfusion value (Motility Liquid, Perimed, Järfälla, Sweden). Prior to the start of each assessment, the arm and the foot were immobilized with a vacuum cushion to ensure the participant was comfortably positioned. In order to take into account regional differences (Balaz et al., 2015; Hamdy et al., 2001), one LDF probe was positioned on the anterior face of the forearm and the other on dorsal part of the foot (between second and third metatarsal head). By doing so, each probe was placed on intact, healthy non-glabrous skin. Cutaneous microvascular perfusion was then recorded for 20 min with as little disruption to the patient as possible. Skin temperature was maintained at 32 °C throughout the recording. Cutaneous microvascular perfusion was quantified in conventional perfusion units (PU). Systolic and diastolic blood pressures were monitored using a digital sphygmomanometer (OMRON 907, Omron Healthcare, Kyoto, Japan).

2.2. Data processing

2.2.1. The detection of outliers

In the context of a clinical setting and cohort study, the signals recorded in this present study have not been manipulated before the Wavelet Analysis, contrary to the smoothing method often applied to LDF data. The 20-minute LDF recordings served as a basis for outlier detection and removal. An outlier can be any combination of two types of artefacts: 1) a single very strong amplitude artefact lasting a short time; or 2) successive small amplitude fluctuations over a longer duration. To overcome this problem, a metric of the statistical dispersion of perfusion signals was computed (Matlab R2019a, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). This metric was used to detect outliers in a simple, three-step procedure, applied on temporal signals without need of a physical engineer.

The first step was based on the comparison of each perfusion data point at a specific anatomical measurement site with the Median Absolute Deviation (MAD) computed over the full recording at that site. The MAD, which is a robust measure of the variability of quantitative data, was used here as a reference since the data was not normally distributed. A data point in the temporal perfusion signal was considered as a temporal outlier if its perfusion value was more than three-scaled MAD away from the median. In step two, the number and amplitude of the detected temporal outliers were analysed. In order to take both types of artefacts into account, the relative number of temporal outliers (i.e. the number of detected temporal outliers divided by the total number of data points in the signal) and the median value of the detected temporal outliers were computed. Finally, step three, recordings with values larger than one median, plus two times the inter-quartile range, in either of the figures computed over the 65 recordings, was considered an outlying case and was, therefore, removed from the dataset prior to further analysis.

2.2.2. Wavelet transform

Following the early work of Bracic and Stefanovska (1998) and the subsequent work of Kvandal et al. (2006), Kvernmo et al. (1998) and Stefanovska et al. (1999), continuous Wavelet Transforms were computed from the valid temporal data. Indeed, Morlet wavelets have demonstrated the best reproduction of a Fourier power spectrum (Kirby, 2005). In order to optimise the processing speed, the transform was based on an algorithm using the Fourier Transform directly implemented in the Matlab Wavelet Library. For this study, the non-dimensional frequency parameter, ω_0 , was set to six for the continuous Wavelet Transforms to be invertible. This method results in a scale to frequency Fourier factor close to unity.

As Wavelet Transforms are applied to a finite length time series, the transform inevitably suffers from edge effects due to the computation of

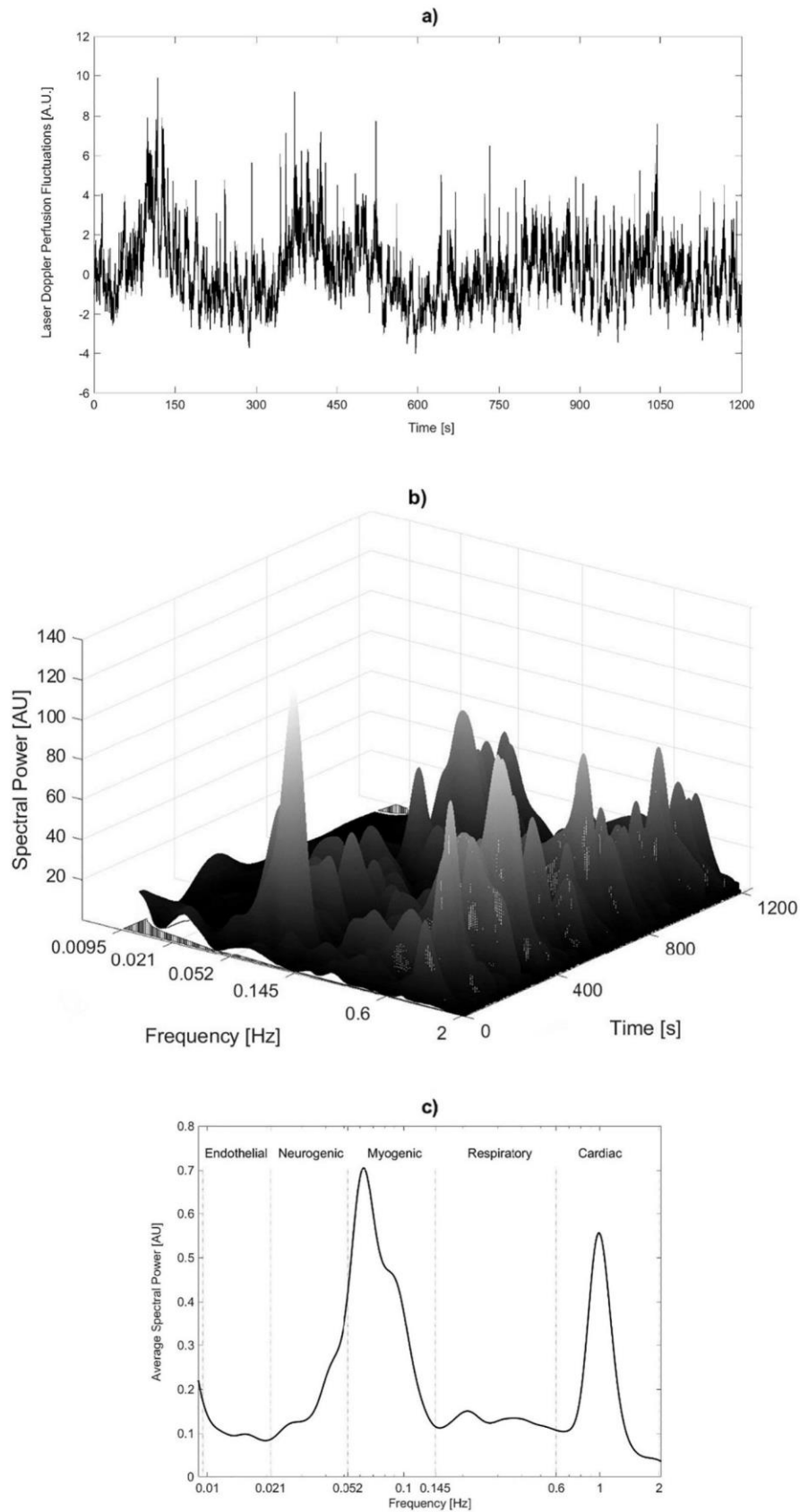


Fig. 1. Data processing workflow. a) Temporal evolution of the skin perfusion (only fluctuating part shown), b) Time-Frequency wavelet power spectrum of the signal (shaded values in the Cone Of Influence), c) Time averaged wavelet power spectrum of the signal.

missing values within the series. However, these confounding effects were mitigated using zero padding at both ends of the temporal signal. This padding method was preferred as it does not introduce any new behaviour, in contrast to other padding methods, as demonstrated by Iatsenko et al. (2015). Zero padding, however, introduces distortions to the spectral amplitude near the edges. Such distortions become important as lower recording frequencies are used (i.e. larger periods) since more zeroes enter the analysis. The cone of influence (Fig. 1b) delimits regions of the wavelet spectrum in which such edge effects become important. These regions are of particular interest in our study because they can become critical for short time recordings; the cone of influence at both ends can dramatically reduce the available data particularly at a low frequency. The processing of a signal of 20 min in duration acquired at 32 Hz results in a time-frequency power spectrum containing 362 frequency points and 38,400 temporal points (Fig. 1a & b). Although Wavelet Transforms provide a time-frequency representation of the nonstationary signal, time-averaged power spectrums were computed in this present study. These time-averaged spectrums were computed only on data not affected by edge effects (i.e. data outside the cone of influence).

The time-averaged spectrums were then split into the following five frequency bands: Band V, Endothelial [0.0095–0.02 Hz]; Band IV, Neurogenic [0.02–0.06 Hz]; Band III, Myogenic [0.06–0.15 Hz]; Band II, Respiratory [0.15–0.4 Hz]; and Band I, Cardiac [0.4–1.6 Hz] (Fig. 1.c). Finally, the relative level (i.e. the mean level of a particular frequency band divided by the mean level of the total spectrum) was computed for each sample (Kvandal et al., 2006; Kvernmo et al., 1998; Stefanovska et al., 1999).

2.3. Statistical analysis

The primary outcome of this study was to compare and validate the shorter durations of LDF recording against the 20-minute reference recording. For this purpose, recordings of different durations were generated by applying a one-minute cut-off (until 10 min) at the end of the reference signal. Each signal underwent the same Wavelet Transforms and focused on the low frequency components of the average spectrum in Band III, IV and V, relative to myogenic, neurogenic and endothelial events, respectively.

Since the data were not normally distributed, Wilcoxon paired tests were used to compare data sets for each low frequency component of the perfusion signal at both anatomical sites. A Spearman rank correlation coefficient was used to analyse the degree of association between each low frequency component of each recording duration against the 20-minute reference recording.

A Passing-Bablok regression is a robust, nonparametric method for comparing methods since it allows measurement errors in both variables, does not assume normal distribution of errors and can provide binary answers for the comparison (Passing and Bablok, 1983). This method compares a reference dataset x from one measurement method with a dataset y obtained using an alternative measurement method by fitting the parameters “ a ” (the intercept) and “ b ” (the slope) of the linear equation, $y = a + bx$, using non-parametric methods. The quality of the fit can be estimated by statistics in accordance with the following criteria: 1) The fitted value of the intercept is assessed assuming that 0 is in the 95% confidence intervals (CI) of “ a ”; 2) The fitted value of slope “ b ” is assessed assuming that 1 is in the CI of b . Note that if 0 is not in the CI of “ a ”, there is a systematic difference, and if 1 is not in the CI of “ b ”, then there is a proportional difference between the two methods; 3) The method is completed by a linearity test to verify that the relationship between the two measurement methods is stable in the field of study. This test is based on a CUSUM statistic in which the p value determines if there is a significant deviation from linearity. Owing to the large amount of comparisons, these three criteria are rendered as binary, Yes/No, data.

The duration of recording for each frequency band was rejected

when at least two of Passing-Bablok regression criteria were not met, or when at least one of the Passing-Bablok regression criteria was not met on two consecutive recordings of different durations. The Passing-Bablok regression analyses were performed for the whole sample and for sub-groups analysis (women and men).

The sample size and power of the Passing-Bablok regression analyses were determined according to the procedures described by Passing and Bablok (Passing and Bablok, 1984). Considering a 7% measurement error and a common size for both methods of about 10, as observed in previous studies performed by our team with the same equipment and population (Vinet et al., 2015), a sample size of 30 or less was recommended for the slope to be in the 95% CI of the sample with a power of at least 80% and a false positive result probability restricted to 5%. The large size of the initial sample (i.e. 65 subjects) included from the start of this study ensured greater power and accounted for any potential sample size reduction due to outliers. The statistical analysis was performed using MedCalc Software, (MedCalc, V19.0.5–64bit, Ostend, Belgium). A p -value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The clinical characteristics of the participants are reported in Table 1. After outliers were detected among the initial sample of 65 participants, six participants (four males and two females) were excluded from foot cutaneous blood perfusion analysis ($n = 59$) and 11 participants (seven males and four females) from the forearm cutaneous blood perfusion analysis ($n = 54$) (Fig. 2). The Wilcoxon and Spearman tests revealed that there were no significant differences between the 20-minute reference recording and each other recording of varying duration, regardless of the frequency band of the recording and the anatomical site of the recording.

As reported in Table 2, there were significant, high Spearman coefficients ($p < 0.0001$) indicating very strong correlations between all of the tested LDF recording durations and the 20-minute reference recording, for each anatomical recording site and for each low-frequency signal.

Table 3 details the results of the Passing-Bablok regression for Systematic Difference (Syst. Diff.), Proportional Difference (Prop. Diff.) and Linearity in binary form. Based on the proposed validation criteria of the Passing-Bablok regression, the optimal durations of LDF recording on the forearm were 10 min, 15 min and 10 min for myogenic, neurogenic and endothelial events, respectively. The optimal durations of recording on dorsum of the foot were 10 min, 13 min and 13 min for the same frequency bands (i.e. physiological events), respectively.

Fig. 3 illustrates the Passing-Bablok regression plots comparing the 20-minute reference recording (x axis) with the minimal LDF recording duration (y axis) in each frequency band and for each anatomical site. These LDF recording durations were identified in Table 3 as the last duration validating the 3 criteria. According to this process, substitution of the 20-minute recording by shorter durations can reasonably be considered. Fig. 3 also shows, that under such conditions, there is a good correspondence between the regression line and the identity line (equation $y = bx$); and, depending on anatomical site and frequency band of the recording, a maximum of four to seven participants lie

Table 1

Anthropometric data of whole subject and sub-groups (mean \pm SD). SBP systolic blood pressure; DBP diastolic; HR heart rate; BMI body mass index.

	All subjects ($n = 65$)	Men ($n = 34$)	Women ($n = 31$)
Age (yr)	34,0 \pm 12,6	35,5 \pm 13,2	32,4 \pm 12,0
SBP (mm Hg)	121,4 \pm 13,1	127,9 \pm 11,4	114,3 \pm 11,1
DBP (mm Hg)	71,4 \pm 13,2	72 \pm 14,4	70,8 \pm 11,9
HR (bpm)	68,0 \pm 11,8	61,5 \pm 9,4	69,5 \pm 10,4
BMI (kg/m ²)	23,3 \pm 4,7	24,8 \pm 3,3	21,6 \pm 5,4

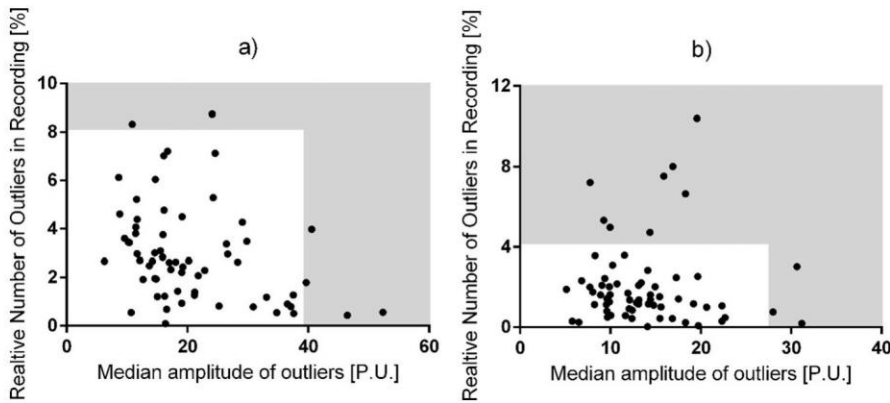


Fig. 2. Relative number of artefacts as a function of the median amplitude value of the artefact detected in the 20-minute reference recording for each participant. Recording on the (a) foot and on the (b) forearm. Grey: Outlier zone corresponding to values greater than Median \pm 2 I.Q. Points in the grey zones are excluded from the study.

Table 2

Spearman correlation coefficients between each recording duration and 20 min reference recording for myogenic, neurogenic and endothelial component at foot and forearm site ($p < 0,0001$). Background color code: ■ $r < 0,90$; ■ $0,90 \leq r < 0,95$; ■ $r \geq 0,95$.

Spearman Coefficient		20 - 19	20 - 18	20 - 17	20 - 16	20 - 15	20 - 14	20 - 13	20 - 12	20 - 11	20 - 10
Foot	MYO	0,976	0,967	0,969	0,965	0,962	0,958	0,957	0,950	0,931	0,915
	NEURO	0,995	0,961	0,957	0,951	0,941	0,934	0,928	0,905	0,846	0,837
	ENDO	0,963	0,955	0,948	0,940	0,924	0,914	0,914	0,898	0,868	0,819
Forearm	MYO	0,992	0,982	0,978	0,977	0,968	0,968	0,958	0,953	0,945	0,944
	NEURO	0,985	0,976	0,956	0,940	0,918	0,913	0,898	0,866	0,858	0,852
	ENDO	0,986	0,970	0,930	0,903	0,889	0,884	0,838	0,819	0,828	0,842

Table 3

Passing Bablok tests for Systematic Difference (Syst. Diff.), Proportional Difference (Prop. diff.) and Linearity for correlations between each recording duration and 20 min reference recording for myogenic (MYO), neurogenic (NEURO) and endothelial (ENDO) component.

FOREARM		20 - 19	20 - 18	20 - 17	20 - 16	20 - 15	20 - 14	20 - 13	20 - 12	20 - 11	20 - 10
MYO	Syst. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Prop. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Linearity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
NEURO	Syst. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N
	Prop. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N
	Linearity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ENDO	Syst. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Prop. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Linearity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
FOOT		20 - 19	20 - 18	20 - 17	20 - 16	20 - 15	20 - 14	20 - 13	20 - 12	20 - 11	20 - 10
MYO	Syst. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Prop. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Linearity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
NEURO	Syst. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N
	Prop. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N
	Linearity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
ENDO	Syst. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N
	Prop. Diff.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N
	Linearity	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

outside the limits of the 95% CI.

In men, the optimal duration of LDF recording was reduced to 10 min, regardless of the frequency band and whatever the anatomical site. In women, the optimal duration of LDF recording on forearm was not different for the whole group. On the dorsum of the foot, data indicated that a reduction in the duration of LDF recording, to as low as 10 min, could only be applied for assessments of the endothelial band.

4. Discussion

The main finding in this study is that 15 min of cutaneous blood perfusion LDF-recordings is sufficient to provide a reliable wavelet-based spectral analysis. This outcome represents a 5-min saving on the 20-min reference recording, a duration of LDF recording that has been widely used in previous research. Indeed, this result is critically important for studies involving patients who have difficulties with prolonged immobility or in participants who have frequent or continuous

involuntary movements, and also when studies require participants to undergo a series of consecutive assessments. While these findings can minimize the research demands that burden the participant, it must be acknowledged that this minimal duration of LDF must be performed under optimal conditions (e.g. quiet ambiance, stable room temperature, patient immobility) for data to maintain its quality.

It is also important to recognise that the optimal duration of LDF recording was dependent on several factors, including which intrinsic control mechanism was of primary interest, as well as on the population and the anatomical site being assessed. Indeed, while 15 min of LDF recording is shown to be sufficient, this duration can even be reduced further if only a specific frequency band is of interest. The results of this study indicate that the 15-minute recommendation is related to neurogenic events. Such influence can be explained by the fact that cutaneous blood perfusion depends on neuro-regulation, which has local and central origins that are difficult to discern. Consequently, the neurogenic component is very sensitive to minor events such as stress,

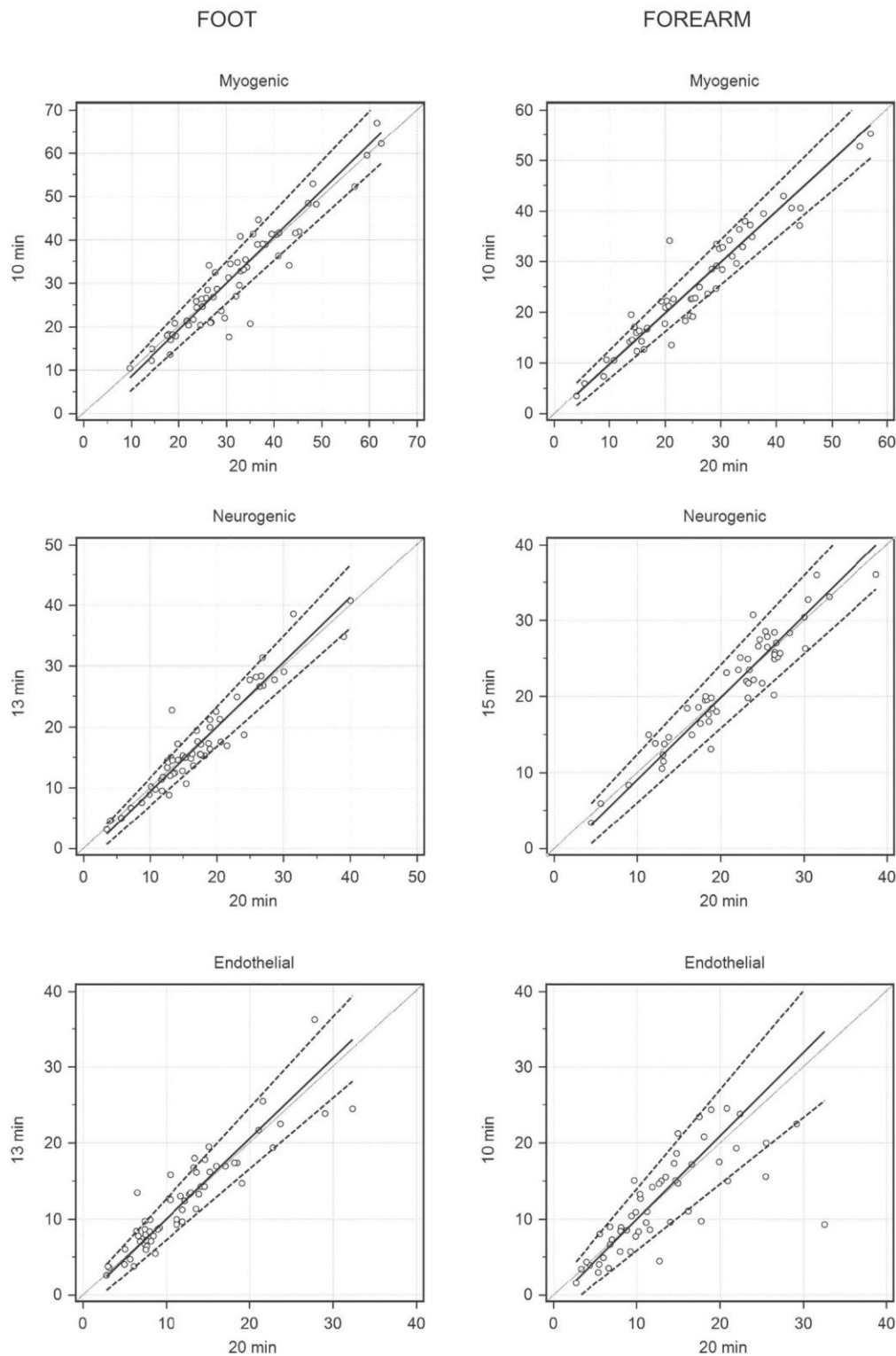


Fig. 3. Passing Bablok regression plots for minimal recording duration for foot (Left Column), Myogenic band (Top), Neurogenic band (Middle), Endothelial band (Bottom) and similar bands on the forearm (Right Column). Legend: — Linear Regression — Upper and lower 95% CI linear regression limits - - Identity line ($x = y$).

temperature, noise etc. Moreover, [Borzykh et al. \(2009\)](#) reported that there was reduced efferent sympathetic activity with training in rats, which may reduce the neurogenic tone of skin blood vessels. Unfortunately, the daily physical activity habits of the enrolled participants was not recorded or accounted for, a factor which could influence their microvascular function and confound such data. In this context,

fluctuations in the neurogenic band are more prone to various perturbations and may be hardest to stabilize.

The duration of LDF recording could be further reduced to 10 min when only myogenic events were of interest, regardless of the anatomical site being assessed and whatever the gender. This reduction in the duration of LDF recording may be explained by the higher frequency of

the recording signal [i.e. 0.06–0.15 Hz]. When considering endothelial events, the duration of LDF recording could be reduced to 13 min on the foot and to 10 min on the forearm. During a recording of 10 or 13 min, the lowest frequency endothelial oscillation takes place approximately six to seven times, sufficient to provide a representation of its role in the cutaneous blood perfusion signal.

The minimum duration of LDF recording varied between the forearm and the foot on low frequency bands. Indeed, this may be explained by the regional differences in the mechanisms that regulate cutaneous blood perfusion, which exist between the lower and upper limbs (i.e. the dorsum of the foot and the forearm) (Hodges and Del Pozzi, 2014). Cutaneous blood perfusion measured from the volar region of the forearm has been commonly used to assess microvascular function in humans due, in part, to being an easily accessible area of the human body. Moreover, microvascular dysfunction may occur in the lower extremities (e.g. diabetic neuropathy) without significant changes in blood vessels of the upper extremities. It was therefore interesting to investigate the minimum duration of a LDF recording required for assessing the spectral components of the upper and lower limbs. The reasons explaining the increase in recording duration in the neurogenic band (13 min vs 15 min), and the decrease in the endothelial band (13 min vs 10 min), between the foot and the forearm were unclear. Potential explanations for these differences may be related to the different hydrostatic stresses experienced in the standing position and/or the heterogeneous adrenergic-mediated vascular responses in upper and lower limbs (Hodges and Del Pozzi, 2014). However, our analysis was completed in a supine position, which should minimize the impact of hydrostatic stress. The observed differences were not explained by the difference in the type of skin. Indeed, the skin at the dorsum foot and on the forearm are both non-glabrous (Jan et al., 2019).

A gender analysis demonstrated that LDF recordings with a shorter duration (i.e. 10 min) could be achieved in men whatever the anatomical site of recording. A longer duration of recording was needed in women for the neurogenic band (e.g. 15 min for recording on the foot). Previous correlations between estradiol and LDF response were reported only during follicular phase in relation with the sympathetic-inhibitor effect of oestrogens (Cankar et al., 2016; Gerhardt et al., 2000). This reduced sympathetic activity may thus lead to a reduction of the neurogenic tone in cutaneous blood perfusion. However, this longer duration of recording for the neurogenic band was only reported on the forearm and not on the foot. Among the 31 women, only 10 were in their follicular period and 14 were in their luteal period; the remaining were menopausal. Unfortunately, these sub-groups of women may not be of adequate size (i.e. 30 participants) to make interpretations using this data to assess these subgroups. This highlights the need to take into account for the menstrual phase in future studies.

4.1. Limitations

Only low-frequency bands have been analysed in our study, but respiratory and heartbeat contributions represent < 2.5% of the rhythmic changes in cutaneous blood perfusion (Häfner et al., 2007). While we chose 10 min for a minimal LDF recording duration, some researchers have conducted Wavelet Analysis with only 2 min of recording (Hodges et al., 2019). Short recording durations may be interesting when assessing external stimuli-mediated variations in cutaneous blood perfusion, but this present study focused on basal recording. Although the sample size is larger than needed to achieve appropriate statistical power, the sample size could be increased to generalize our recommendations further. Indeed, our results cannot be generalized to smokers and to pathological groups. We did not assess the microvascular function in smokers as previous studies reported a negative impact of smoking on microvascular function, including reduced myogenic-dependent skin flowmotion in the basal state (Rossi et al., 2014). Indeed, including smokers would have confounded the

results of this study. Another limitation of the study might be that we did not include pathophysiological groups. Pathological patients usually have disturbed flowmotion, even at rest (Vinet et al., 2015); presenting high inter-participant variability. On the other hand, the purpose of this study was not to evaluate the impact of pathological disease, per se, on microvascular function, but to identify a methodological approach. Including them would also have interfered with our results. These populations could provide a future extension of this study.

5. Conclusion

Flowmotion analysis is an important area of basic and clinical science. This study provides new recommendations for the minimum duration of LDF recording required to maintain quality in a Wavelet Analysis across several low-frequency signals. Depending on the aim of any given study, LDF recordings of at least 15 min on forearm and 13 min on the foot can be performed whilst maintaining a quality WA on low-frequency bands. Indeed, these findings further determine the applicability of this technique in a clinical setting. However, in the context of clinical widespread practice, these new recommendations for the optimal duration of LDF recording need to be confirmed in further studies that include participants with pathology.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRediT authorship contribution statement

C. Reynès: Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **A. Vinet:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **O. Maltinti:** Funding acquisition. **Y. Knapp:** Conceptualization, Funding acquisition, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing.

References

- Balaz, D., Komornikova, A., Kruzliak, P., Sabaka, P., Gaspar, L., Zulli, A., Kucera, M., Zvonicek, V., Sabo, J., Ambrozy, E., Dukat, A., 2015. Regional differences of vasodilatation and vasomotion response to local heating in human cutaneous microcirculation. *Vasa* 44 (6), 458–465.
- Borzykh, A.A., Andreev-Andrievskii, A.A., Borovik, A.S., Sharova, A.P., Tarasova, O.S., 2009. Effect of aerobic training on innervation density and neurogenic responses of skin afferent blood vessels. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148 (1), 5–8.
- Bracic, M., Stefanovska, A., 1998. Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics. *Bull. Math. Biol.* 60 (5), 919–935.
- Cankar, K., Music, M., FINDERLE, Z., 2016. Cutaneous microvascular response during local cold exposure - the effect of female sex hormones and cold perception. *Microvasc. Res.* 108, 34–40.
- Gerhardt, U., Hillebrand, U., Mehrens, T., Hohage, H., 2000. Impact of estradiol blood concentrations on skin capillary Laser Doppler flow in premenopausal women. *Int J Cardiol.* 75 (1), 59–64.
- Häfner, H.-M., Bräuer, K., Eichner, M., Koch, I., Heinle, H., Röcken, M., Strölin, A., 2007. Wavelet analysis of skin perfusion in healthy volunteers. *Microcirculation* 14, 137–144.
- Hamdy, O., Abou-Elenin, K., LoGerfo, F.W., Horton, E.S., Veves, A., 2001. Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care* 24 (2), 344–349.
- Hodges, G.J., Del Pozzi, A.T., 2014. Noninvasive examination of endothelial, sympathetic, and myogenic contributions to regional differences in the human cutaneous microcirculation. *Microvasc. Res.* 93, 87–91.
- Hodges, G.J., Mallette, M.M., Cheung, S.S., 2019. The reliability of cutaneous low-frequency oscillations in young healthy males. *Microcirculation* 26 (6), e12546.
- Holowatz, L.A., Thompson-Torgerson, C.S., Kenney, W.L., 2008. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J. Appl. Physiol.* 105, 370–372.
- HRV Task force report, 1996. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 93 (5), 1043–1065.
- Iatsenko, D., McClintock, P.V.E., Stefanovska, A., 2015. Linear and synchrosqueezed time frequency representations revisited : overview, standards of use, resolution, reconstruction, concentration, and algorithms. *Digital Signal Processing* 42, 1–26.
- Jan, Y.-K., Liao, F., Cheing, G.L.Y., Pu, F., Ren, W., Choi, H.M.C., 2019. Differences in skin

C. Reynès, et al.

Microvascular Research 131 (2020) 104034

- blood flow oscillations between the plantar and dorsal foot in people with diabetes mellitus and peripheral neuropathy. *Microvasc. Res.* 122, 45–51.
- Kirby, J.F., 2005. Which wavelet best reproduces the Fourier power spectrum? *Comput. Geosci.* 31, 846–864.
- Kvandal, P., Landsverk, S.A., Bernjak, A., Stefanovska, A., Kvernmo, H.D., Kirkeboen, K.A., 2006. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc. Res.* 72, 120–127.
- Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Bracic, M., Kirkeboen, K.A., Kvernebo, K., 1998. Spectral analysis of the laser Doppler perfusion signal in human skin before and after exercise. *Microvasc. Res.* 56, 173–182.
- Martini, R., Bagno, A., 2018. The wavelet analysis for the assessment of microvascular function with the laser Doppler fluxmetry over the last 20 years. Looking for hidden informations. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 70 (2), 217–229.
- Passing, H., Bablok, W., 1983. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, part I. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21 (11), 709–720.
- Passing, H., Bablok, W., 1984. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, part II. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22 (6), 431–445.
- Rossi, M., Carpi, A., Galetta, F., Franzoni, F., Santoro, G., 2006. The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? *Biomed. Pharmacother.* 60, 437–442.
- Rossi, M., Pistelli, F., Pesce, M., Aquilini, F., Franzoni, F., Santoro, G., Carrozzi, L., 2014. Impact of long-term exposure to cigarette smoking on skin microvascular function. *Microvasc. Res.* 93, 46–51.
- Stefanovska, A., Bracic, M., Kvernmo, H.D., 1999. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 46, 1230–1239.
- Sun, P.-C., Kuo, C.-D., Chi, L.-Y., Lin, H.-D., Wei, S.-H., Chen, C.-S., 2013. Microcirculatory vasomotor changes are associated with severity of peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 10, 270–276.
- Vinet, A., Obert, P., Dutheil, F., Diagne, L., Chapier, R., Lesourd, B., Courteix, D., Walther, G., 2015. Impact of a lifestyle program on vascular insulin resistance in metabolic syndrome subjects: the resolve study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2), 442–450.

2. Étude 2:

Concomitant peripheral neuropathy and type 2 diabetes impairs post-exercise cutaneous perfusion and flowmotion

Le diabète de type 2 associé à la neuropathie périphérique altère les perfusions cutanées et le flowmotion en récupération post-exercice

CONCOMITANT PERIPHERAL NEUROPATHY AND TYPE 2 DIABETES IMPAIRS POST-EXERCISE CUTANEOUS PERFUSION AND FLOWMOTION

Cécile Reynès¹, Jean-Baptiste Beaume¹, Françoise Latil-Plat², Houda Ennaifer², Laure Rocher², Sophie Antoine-Jonville¹, Eric Benamo², Yannick Knapp¹, Agnès Vinet^{1*}

¹*Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France*

²*Service endocrinologie et maladies métaboliques, Centre hospitalier Henri Duffaut, Avignon, France*

En cours de révision dans Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Résumé de l'étude 2

La dysfonction microvasculaire participe à la pathogénèse de la NP. Des études ont montré une altération des réponses microvasculaires chez les DT2 exacerbées en présence de NP au niveau non seulement des perfusions cutanées mais aussi du flowmotion au repos. L'exercice, en tant que stimulus vasodilatateur hémodynamique, pourrait dévoiler et/ou exacerber les dysfonctions subtiles chez les DT2 avec NP et ce, dépendamment du niveau de sévérité de la NP. A notre connaissance, aucune étude n'avait examiné les perfusions cutanées en réponse à l'exercice dans une population de DT2 avec NP.

L'objectif de l'étude était d'explorer les modifications de la perfusion microvasculaire et du flowmotion au cours de la récupération post-exercice chez les personnes DT2, avec ou sans NP confirmée ou infraclinique, ainsi que chez des sujets contrôles normo-pondérés et en situation d'obésité.

Le flux sanguin cutané a été enregistré pendant 15 minutes au repos et pendant 10 minutes de récupération post-TM6 chez 86 sujets (16 contrôles normo-pondérés, 22 en situation de surpoids ou d'obésité, 16 DT2 sans NP, 15 DT2 avec NP infraclinique, 17 DT2 avec NP confirmée). L'enregistrement a été effectué avec une caméra LSCI et une sonde LDF sur la partie dorsale du pied. Les signaux LDF ont subi une décomposition en ondelettes pour analyser les mécanismes de contrôle du flowmotion (endothéliaux NO-indépendant et NO-dépendant, neurogénique, myogénique, respiratoire et cardiaque).

Les résultats ont démontré une augmentation du flux sanguin cutané mesuré par LSCI ou LDF en récupération post-TM6 dans tous nos groupes démontrant que le test sous-maximal utilisé engendrait bien une vasodilatation. Cette augmentation était inférieure chez les DT2 avec NP infraclinique et DT2 avec NP confirmée, respectivement pour le LDF et le LSCI, par rapport aux trois autres groupes. Après l'exercice, la puissance du spectre total était augmentée dans tous les groupes. Les contributions relatives des bandes endothéliales étaient plus faibles chez les DT2 avec NP confirmée que chez les sujets contrôles normo-pondérés et ceux en situation de surpoids ou d'obésité. La contribution neurogénique était diminuée dans tous les groupes mais, dans une moindre mesure, chez les DT2 avec NP confirmée et chez les DT2 sans NP, par rapport aux DT2 avec NP infraclinique et les sujets en situation de surpoids ou d'obésité.

La NP, quel que soit le stade, modifie la réponse microvasculaire à l'exercice en lien avec des altérations des mécanismes endothéliaux et neurogénique.

1 **CONCOMITANT PERIPHERAL NEUROPATHY AND TYPE 2 DIABETES IMPAIRS POST-**
2 **EXERCISE CUTANEOUS PERFUSION AND FLOWMOTION**

3
4 Reynès Cécile¹ cecile.reynes@gmail.com, Beaume Jean-Baptiste¹ beaume.apas@gmail.com, Latil-
5 Plat Françoise² FPlat@ch-avignon.fr, Ennaifer Houda² ennaifer.houda@ch-avignon.fr, Rocher
6 Laure² rocher.laure@ch-avignon.fr, Antoine-Jonville Sophie¹ sophie.antoine@univ-avignon.fr,
7 Benamo Eric² ebenamo@ch-avignon.fr, Knapp Yannick^{1*} yannick.knapp@univ-avignon.fr, Vinet
8 Agnès^{1*} agnes.vinet@univ-avignon.fr

9 ¹*Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France*

10 ²*Service endocrinologie et maladies métaboliques, Centre hospitalier Henri Duffaut, Avignon,*
11 *France*

12 **These authors contributed equally*

13

14 **Short title: Microcirculation and exercise in diabetes**

15

16 **Corresponding author :** Avignon Université, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, F-84000,
17 Avignon, France. agnes.vinet@univ-avignon.fr

18

19 **Rewievers :** Sheri R. Colberg, scolberg@odu.edu

20 Gary J. Hodges, ghodges@brocku.ca

21 Helena Lenasi, helena.lenasi.ml@mf.uni-lj.si

22

23 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or
24 not-for-profit sectors.

25 The authors have nothing to disclose.

26 Abstract

27

28 **Aim:** The study investigated changes in microvascular perfusion during post-exercise recovery in
29 those with type 2 diabetes, with or without peripheral neuropathy, as well as in healthy controls and
30 those with obesity.

31 **Methods:** Skin blood perfusion was assessed in each group using laser doppler flowmetry and laser
32 speckle contrast imaging before and immediately after a six-minute walking test. laser doppler
33 flowmetry recordings underwent wavelet transformation to allow specific control mechanisms of
34 blood perfusion to be studied (e.g. endothelial nitric oxide independent and dependent, neurogenic,
35 myogenic, respiratory and cardiac mechanisms).

36 **Results:** Laser speckle contrast imaging and laser doppler flowmetry perfusion increased after
37 exercise in all groups. The increase was blunted in those with subclinical peripheral neuropathy and
38 confirmed peripheral neuropathy, when compared to the other three groups. After exercise, total
39 spectral power increased in all groups. The relative contributions of each endothelial band was
40 lower in those with confirmed peripheral neuropathy than in the healthy controls and those with
41 obesity. Neurogenic contribution decreased less in those with confirmed peripheral neuropathy and
42 in those with type 2 diabetes alone, compared to those with subclinical peripheral neuropathy and
43 those with obesity.

44 **Conclusion:** Peripheral neuropathy, whatever the stage, altered the microvascular response to
45 exercise via impaired endothelial and neurogenic mechanisms.

46

47 **Keywords:** flowmotion; laser Doppler flowmetry; laser speckle contrast imaging; peripheral
48 neuropathy; physical exercise; skin blood perfusion.

49 Introduction

50 Peripheral neuropathy is one of the most common complications of type 2 diabetes and, in severe
51 cases, can lead to the development of foot ulceration ¹. It has been well established that
52 microvascular dysfunction plays a prominent role in the development of peripheral neuropathy in
53 diabetes ². Indeed, there is a substantial body of evidence demonstrating that microvascular
54 reactivity is impaired in those with type 2 diabetes, but to an even greater extent in those also
55 impacted by peripheral neuropathy ³.

56 Many studies have reported not only blunted skin blood perfusion in those with type
57 2 diabetes, but also altered flowmotion, which explores the underlying mechanisms of skin blood
58 perfusion (i.e. endothelial nitric oxide-dependent and -independent, neurogenic, myogenic,
59 respiratory and cardiac control). In those with type 2 diabetes, there is often a decrease in the total
60 power spectrum, with reductions in the endothelial, neurogenic, myogenic, respiratory or cardiac
61 components of skin blood perfusion ⁴⁻⁶. Whether these impairments worsen during post-exercise
62 recovery has never been evaluated and the impact of exercise in those with type 2 diabetes, on
63 microvascular function is yet to be determined. Only Colbert *et al.* have assessed post-exercise skin
64 blood perfusion in trained and sedentary persons with type 2 diabetes; reporting an exercise-
65 mediated increase in skin blood perfusion in the trained group only ⁷. However, to the best of our
66 knowledge, no study has compared post-exercise skin blood perfusion between those with type
67 2 diabetes and control populations. Furthermore, the impact of peripheral neuropathy has not yet
68 been explored.

69 Accordingly, this study aimed to compare skin blood perfusion and flowmotion responses
70 following a six-minute walking test (6MWT) in those with type 2 diabetes, with or without
71 peripheral neuropathy, as well as in healthy, normal-weight controls and those with obesity.

72 **Materials and methods**

73 **Participants**

74 The NEUROMICRO trial (NCT03847779) is a clinical study designed to examine flowmotion
75 following different stimuli in persons with type 2 diabetes. Eighty-six participants (38 females,
76 48 males) aged 40-73 years were included in the study after providing their informed written
77 consent. Forty-eight of those participants were patients with type 2 diabetes; 16 without peripheral
78 neuropathy, 15 with subclinical peripheral neuropathy and 17 with confirmed peripheral
79 neuropathy. Of the other 38 participants, 22 had obesity and were comparable to those with type
80 2 diabetes for BMI, while the remaining 16 were considered healthy and normal-weight, matched
81 for age and sex to form the control group. All participants without diabetes (i.e. those with obesity
82 and the healthy controls) were normotensive, were not using any medications and had no evidence
83 of cardiopulmonary disease. Patients with type 2 diabetes who had a history of ulceration, a toe-
84 brachial index <0.7 (indicating peripheral vascular disease ⁸), or a history of using of vasoactive
85 medications (e.g. calcium channel blockers), were excluded. In order to implement a real-life
86 scenario in this study, patients maintained their quotidian medication (e.g. high blood pressure,
87 dyslipidaemia, glycaemic control or pain treatments) throughout the study (Table 1).

88 **Assessment of peripheral neuropathy and other complications**

89 Peripheral neuropathy was detected by a Neuropathy Symptom Score questionnaire >3 ⁹. Briefly,
90 the presence of peripheral neuropathy was based on alteration of large and/or small nerve fibres.
91 Large nerve fibres were tested via sural nerve conduction using a DPNCheck device (Neurometrix,
92 Waltham, MA). Abnormal nerve conduction was considered when an amplitude of $\leq 5\mu V$ or a
93 velocity of $\leq 41m/s$ was reached ¹⁰. An alteration of the small nerve fibres was considered when a
94 score under three for hot or cold sensibility was obtained, or if a thermal pain threshold was not
95 reached between 35-45°C when being assessed with NerveCheck (Phi Med Europe S.L., Barcelona,
96 Spain). In accordance with the Toronto Consensus ¹¹, peripheral neuropathy was confirmed when
97 signs and symptoms were detected. In absence of symptoms, but in presence of signs, peripheral
98 neuropathy was defined as subclinical.

99 All participants with type 2 diabetes were also screened for retinopathy, nephropathy,
100 cardiac autonomic neuropathy. Retinopathy was evaluated by dilated fundus examination.
101 Nephropathy was defined as a glomerular filtration rate under 90 mL/min/1.73 m² according to the
102 Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration equation. Cardiac autonomic neuropathy was

103 evaluated with the three Ewing Tests: 1) heart rate response to deep breathing (E/I ratio); 2) heart
104 rate response to standing (30s/15s ratio); and 3) sympathetic neural function via the blood pressure
105 response to standing.

106 **Protocol**

107 All participants were instructed to present to their assessment at least two hours fasted and to abstain
108 from caffeine and smoking. They were also instructed to avoid strenuous physical activity in the
109 24 hours prior to their assessment. Fasting blood samples were collected to

110 assess serum concentrations of triglycerides, total cholesterol, high- and low-density lipoprotein,
111 and glycated haemoglobin in all participants except for the healthy controls. Plasma inflammatory
112 markers including high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) and fibrinogen were also evaluated.

113 All microvascular assessments were performed in a quiet, temperature-controlled room (22-25°)
114 with minimal external disturbances, while the participant remained in a supine position. Prior to
115 starting the skin blood perfusion assessment, the feet were immobilized with a vacuum cushion.

116 After an acclimation period of 20 minutes, basal skin blood perfusion was recorded for 15 minutes
117 on the dorsal right foot. When basal recordings concluded, participants completed the 6MWT.

118 Immediately after the test, participants returned to laying in a supine position. Skin blood perfusion
119 recordings were then restarted within two minutes of the conclusion of the 6MWT, continuing for
120 a total of 10 minutes. Blood pressure was monitored prior to the beginning of the 6MWT, as well
121 as at the start and end of the post-exercise recovery period, using a digital sphygmomanometer
122 (OMRON 907, Omron Healthcare, Kyoto, Japan).

123 **Exercise procedure**

124 The 6MWT was conducted according to the protocol recommended by the American Thoracic
125 Society ¹². Participants were informed to walk as far as they could, back and forth, in a private
126 corridor of 25 meters with distance markers every five meters. The time remaining in the test was
127 announced every 30 seconds and participants were actively encouraged throughout the test. The
128 distance walked was expressed in meters and as a percentage of predicted distance ¹³. At the end of
129 6MWT, the operator measured the distance walked from the nearest distance marker.

130 Heart rate was monitored throughout the 6MWT with a Polar V800® watch and an elastic
131 Polar H10 chest belt® (Polar Electro Inc., New York, USA). The maximum heart rate was identified
132 using Kubios Software (<http://kubios.uef.fi>) as the peak heart rate of the smooth signal (medium

133 threshold artefacts correction). The maximum heart rate was expressed as a percentage of the
134 theoretical maximum heart rate ¹⁴.

135 **Skin blood perfusion measurements**

136 Skin blood perfusion was assessed using laser speckle contrast imaging (PeriCam PSI System;
137 Perimed, Järfälla, Sweden) and a laser Doppler flowmeter system (Periflux 5000, Perimed,
138 Sweden).

139 The laser Doppler flowmeter thermostatic probe (PF 481, Perimed, Stockholm, Sweden)
140 was placed on dorsal surface of the right foot, between second and third metatarsal head, on intact
141 skin. The precise location of the probe was noted in relation to anatomical landmarks, in order to
142 replicate the first assessment of skin blood perfusion, as much as possible, in the post-6MWT
143 assessment. Based on the Doppler principle, the probe emits and detects light partially backscattered
144 in the tissue by moving blood cells, causing a change in frequency. The proportion of non-shifted
145 to shifted light is related to the number of moving cells and the velocity of these cells, and is a
146 characteristic of tissue perfusion. The typical depth of the measurement is 1-1.5 mm, evaluating
147 non-nutritive skin blood perfusion. Laser Doppler flowmetry was recorded continuously at
148 frequency of 32 Hz using an interfaced computer with data acquisition software (Perisoft, Perimed,
149 Järfälla, Sweden).

150 Laser speckle contrast imaging was performed with the laser head placed at 14.4 ± 1.3 cm
151 above the surface of the skin ¹⁵. A 4 cm² region of interest was defined above the LDF probe
152 position. Laser speckle contrast imaging allows for a penetration depth of 0.05 mm, evaluating
153 superficial nutritive skin blood perfusion ¹⁶. Here an invisible infra-red laser beam is spread over
154 the surface of the skin creating a speckle pattern formed by random interference in the backscattered
155 light from the illuminated skin. Blood perfusion is obtained by analysing the variation in the speckle
156 pattern. Skin blood perfusion maps obtained using laser speckle contrast imaging were averaged
157 to get a 2Hz acquisition frequency (PimSoft 1.2.2.0; Perimed) and were expressed as conventional
158 perfusion units (PU).

159 **Data Analysis**

160 For both laser Doppler flowmetry and laser speckle contrast imaging, basal skin blood perfusion
161 was considered to be most stable two minutes into the resting period. Indices of recovery post-
162 6MWT were considered as kinetics with the evolution of skin blood perfusion, each minute from

163 the first to the tenth (R_1 to R_{10}), being expressed in absolute value and as a percentage of resting
164 skin blood perfusion.

165 Continuous Wavelet Transforms following the early work of Bracic and Stefanovska ¹⁷, a
166 well as consecutive work ¹⁸⁻²¹, were computed from the valid temporal data ²². The time-averaged
167 spectrums were split into the following six frequency bands ²³: Band VI, Endothelial nitric oxide-
168 independent [0.005-0.0095 Hz]; Band V, Endothelial nitric oxide-dependent [0.0095–0.021 Hz];
169 Band IV, Neurogenic [0.021–0.052 Hz]; Band III, Myogenic [0.052–0.145 Hz]; Band II,
170 Respiratory [0.145–0.6 Hz]; and Band I, Cardiac [0.6–1.6 Hz]. Finally, the absolute median value
171 of total spectrum and each band was computed; and the relative contribution (i.e. the median level
172 of a particular frequency band divided by the median level of the total spectrum) was calculated for
173 the rest and recovery periods.

174 **Statistical Analysis**

175 All statistical analyses were performed using SPSS® (version 22.0, IBM Corp, Armonk, NY).
176 Variables were expressed as mean \pm SD. A general linear model was used to compare variables
177 between groups for clinical data, for resting and R_1 values. A linear mixed model was used for the
178 kinetics analysis and the comparison between the rest and recovery periods. In the event of a
179 significant group interaction, pairwise comparisons with Bonferoni post-hoc tests were used.
180 According to results of the correlation matrix between skin blood perfusion and potential cofactors,
181 the general linear model was adjusted to skin temperature and the linear mixed model was adjusted
182 to resting skin blood perfusion and/or to the percentage of predicted distance for the 6MWT. A p-
183 value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

184

185 **Results**

186 **Participant characteristics**

187 The clinical characteristics of the participants and their exercise performance data are reported in
188 Table 1. All groups were comparable in terms of sex, age and blood pressure. While concentrations
189 of HbA1C were higher in the three groups with type 2 diabetes when compared to those with
190 obesity, concentrations of total cholesterol, HDL and LDL were lower. There was no difference in
191 the biological variables between any of the groups with type 2 diabetes. Triglycerides and hs-CRP
192 were not different between groups, whereas fibrinogen was higher in those with confirmed

193 peripheral neuropathy. There was no difference in the duration of diabetes or in the presence of
194 retinopathy, nephropathy and cardiac autonomic neuropathy between each of the three groups with
195 type 2 diabetes. The healthy controls walked a longer distance in the 6MWT than all other groups,
196 while those with obesity walked longer distance than the three groups with type 2 diabetes. Thus,
197 the healthy controls had a higher percentage of predicted distance than the three groups with type 2
198 diabetes. Exercise intensity, evaluated by the percentage of maximal heart rate reached during the
199 6MWT, was not significantly different between any of the groups, confirming that all groups
200 performed their 6MWT at a similar sub-maximal intensity (Table 1).

201 **Laser Speckle Contrast imaging**

202 At rest, skin blood perfusion was lower in those with type 2 diabetes, without peripheral neuropathy,
203 than in the healthy controls (Fig.1a); before and after adjustment to basal skin temperature. After
204 the 6MWT, skin blood perfusion expressed as a percentage of resting perfusion significantly
205 increased in all groups at R1, without difference between groups (healthy controls, $+17.7 \pm 6.2\%$;
206 those with obesity, $+24.2 \pm 5.3\%$; type 2 diabetes alone, $+34.3 \pm 8.8\%$; subclinical peripheral
207 neuropathy, $+24.8 \pm 7.4\%$; and confirmed peripheral neuropathy, $+12.2 \pm 7.3\%$; $p=0.21$).
208 Throughout post-exercise recovery, skin blood perfusion decreased in all groups with significantly
209 lower values observed in those with confirmed peripheral neuropathy than in the other groups
210 (Fig.1b). Notably, this result remained unchanged after adjustment to the percentage of 6MWT
211 predicted distance.

212 **Laser Doppler Flowmetry**

213 Skin blood perfusion was not significantly different between groups. It increased after exercise in
214 all groups at R1 without any difference between groups (healthy controls, $+42.1 \pm 14.3\%$; those
215 with obesity, $+25.1 \pm 11.8\%$; type 2 diabetes alone, $+22.0 \pm 14.8\%$; subclinical peripheral
216 neuropathy, $+1.2 \pm 12.4\%$; and confirmed peripheral neuropathy, $+18.1 \pm 11.5\%$; $p=0.29$).
217 However, skin blood perfusion did not change throughout post-exercise recovery in all groups with
218 significantly lower values observed in those with subclinical peripheral neuropathy than any other
219 group ($p<0.0001$). This result was preserved after adjustment to the percentage of 6MWT predicted
220 distance.

221 **Spectral Analysis on LDF signals**

222 During post-exercise recovery, total power increased in all groups due to an increase across
223 all bands in all groups (Table 2). A mixed model interaction was found in total power with a blunted

224 increase in those with confirmed peripheral neuropathy compared to the healthy controls and those
225 with obesity ($p < 0.05$).

226 The relative contribution of endothelial nitric oxide-independent and -dependent
227 mechanisms to the microvascular response increased during post-exercise recovery compared to
228 rest (time effect $p < 0.001$). Lower values were observed in those with confirmed peripheral
229 neuropathy than in those with obesity for nitric oxide-independent function. Nitric oxide-dependent
230 values were also lower in those with confirmed peripheral neuropathy than in those with obesity
231 and the healthy controls (group effect $p < 0.01$; Fig.2a and 2b). The relative contribution from the
232 neurogenic mechanisms decreased during the post-exercise recovery (time effect, $p < 0.0001$) and
233 mixed model revealed an interaction with a blunted decrease in those with type 2 diabetes alone
234 and in those with confirmed peripheral neuropathy, compared to those with subclinical peripheral
235 neuropathy and those with obesity ($-14,56 \pm 9,86\%$ and $-12,23 \pm 6,14\%$ versus $-26,49 \pm 4,73\%$ and
236 $-21,71 \pm 9,40\%$, respectively; interaction, $p = 0.05$; Fig.2c). The myogenic contribution decreased
237 during post-exercise recovery with lower values observed in those with obesity than in those with
238 type 2 diabetes alone (Fig.2d). Finally, the cardiac and respiratory contributions decreased during
239 recovery (time effect, $p < 0.0001$) with higher values observed in those with confirmed peripheral
240 neuropathy than in healthy controls and those with obesity for both bands (Fig.2e and 2f).

241

242 Discussion

243 The present study resulted in two new findings: 1) diabetic peripheral neuropathy, either subclinical
244 or confirmed, worsened the microcirculatory response to exercise across different tissue depths; and
245 2) the reduction in post-exercise skin blood perfusion in those with peripheral neuropathy was
246 associated with impaired endothelial and neurogenic controls.

247 To characterize the exercise-induced vasodilation, changes in skin blood perfusion were
248 determined after the 6MWT. As expected and consistent with a previous study²⁴, this standard daily
249 physical stress was sufficient enough to induce cutaneous vasodilation in all groups. Indeed, this
250 increase was detected whatever the method used (i.e. laser Doppler flowmetry and laser speckle
251 contrast imaging). However, the vasodilation obtained following 6MWT was moderate. In fact, skin
252 blood perfusion reached around 40% of the maximal vasodilation in all groups (assessed by local
253 hyperthermia at 42°C with laser Doppler flowmetry; data not shown). The sub-maximal intensity
254 of the 6MWT (around 70% of the maximum heart rate) and its low duration explains this result.

255 The few other studies on exercise-induced vasodilation often used maximal tests or tests with longer
256 duration, which both induced greater changes ^{7,10,25}. Nevertheless, vasodilation was maintained
257 throughout the recovery period without return to basal skin blood perfusion values. This may be
258 due to the short time recording (i.e. 10 minutes), noting that Potočnik *et al.* observed a return to pre-
259 exercise skin blood perfusion values 20 minutes after incremental maximal cycling exercise in
260 healthy persons ²⁶. The extent of vasodilation was also different between the method used to
261 quantify it (i.e. laser speckle contrast imaging *versus* laser Doppler flowmetry). Apart from their
262 differences in temporal and spatial resolutions ²⁷, laser speckle contrast imaging and laser Doppler
263 flowmetry allowed different vascular beds to be analysed; those being nutritive (in capillary loops and
264 upper plexus) and non-nutritive (in deeper dermal plexus containing arteriovenous anastomoses) in
265 nature, respectively.

266 The decrease in skin blood perfusion measured using laser speckle contrast imaging,
267 observed throughout the post-exercise recovery, may be due to a progressive withdrawal of the
268 vasodilator tone. Those with confirmed peripheral neuropathy had lower skin blood perfusion
269 values during recovery. Such a result may be explained by 1) lower vasodilation during the 6MWT
270 (only +12% at R1 after exercise) and 2) the lower walking distance being covered by these patients
271 ²⁸. However, even when adjusting to the percentage of 6MWT predicted distance, skin blood
272 perfusion remained significantly lower in those with confirmed peripheral neuropathy than in the
273 other groups. This suggests an impaired vasomotor adaptation with the presence of capillary steal,
274 namely a arteriovenous shunting that induces a reduction in blood flow in nutritive vessels during
275 a vasodilating stimulus ²⁹. However, this hypothesis may only be discussed as we assessed skin
276 blood perfusion on non-glabrous skin that is known to not have many arteriovenous anastomoses
277 ^{26,30}.

278 When skin blood perfusion was measured using laser Doppler flowmetry, values did not
279 change throughout the recovery period in all groups. At the beginning of recovery (i.e. at R1), all
280 groups demonstrated an exercise-induced increase in skin blood perfusion. However, this increase
281 was blunted in those with subclinical peripheral neuropathy. This reduced-response may indicate a
282 lack of capillary steal at this early stage of diabetic peripheral neuropathy, implying a decrease in
283 non-nutritive perfusion while nutritive perfusion is maintained.

284 Underlying mechanisms involved during post-exercise recovery followed the same pattern
285 in all groups with an increase in total power that may be attributable to an increased contribution in
286 the two endothelial components (nitric oxide-dependent and -independent) and a reduction in the

287 other control mechanisms. As demonstrated in earlier studies of healthy persons^{20,25}, total power
288 increased during the post-exercise recovery period in all groups due to an increase in all frequency
289 bands. The 6MWT induced changes in skin blood perfusion mediated by thermoregulatory and non-
290 thermoregulatory reflexes such as those of central command, baroreflexes, muscle
291 mechanoreceptors and metaboreceptors³¹. In the subsequent post-exercise recovery period, there
292 was a progressive removal that may explain the continued elevation in total power²⁵. The increase
293 in total power was blunted in those with confirmed peripheral neuropathy when compared to healthy
294 controls and those with obesity. This was consistent with the reduced skin blood perfusion response
295 to exercise and the loss of vasodilation capacity reported in this study.

296 Based on the changes in total power between rest and post-exercise recovery, the relative
297 contribution of each component will be discussed. The increase in the endothelial components
298 (nitric oxide-independent and nitric oxide-dependent) implied that the endothelium contributed to
299 a greater extent to the regulation of skin blood perfusion during post-exercise recovery than at rest
300³². This counterintuitive result, in contrast with the sole two studies that have analysed flowmotion
301 during recovery previously^{20,25}, would gain further verification with the microdialysis of an
302 endothelial vasoactive substance inhibitor (i.e. L-NAME). It can only be speculated that the increase
303 in shear stress induced by exercise may continue to elicit endothelial-dependent vasodilation^{26,32}.
304 An increase in the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor and the upregulation of
305 endothelial nitric oxide synthase could also occur concomitantly³³. The subsequent relative
306 contribution of the endothelial component during recovery can further reduce the resistance in the
307 microvascular networks. This could increase the capacity of the skin circulation to transport and
308 dissipate heat²⁵. Whatever the explanation, this finding suggests that moderate-intensity lower-limb
309 aerobic exercise is an effective stimulus to improve microvascular endothelial function. However,
310 the group effect revealed lower responses in endothelial nitric oxide-independent and -dependent
311 bands in those with confirmed peripheral neuropathy, compared to those considered healthy and
312 those with obesity, consistent with the chronic endothelial dysfunction that would be established in
313 these patients⁶.

314 The neurogenic contribution to the microvascular response decreased during the post-
315 exercise recovery period in all groups, contrasting the findings of Rossi *et al*, in healthy persons.
316 This different result may be explained by using data during recovery following a sub-maximal
317 stimulus such as 6MWT instead of maximal exhaustive exercise on cycle ergometer. It can be
318 hypothesized that this decrease was due to the withdrawal of the active sympathetic vasodilation

319 that occurs during exercise ²⁵; and to a reduction in the signal translation from sympathetic nerve
320 activation to vasoconstriction. The decrease in the neurogenic contribution was to a lesser extent in
321 those with type 2 diabetes alone and in those with confirmed peripheral neuropathy, compared to
322 those with subclinical peripheral neuropathy and those with obesity. This may be explained by over
323 activity of residual nerves in those with subclinical peripheral neuropathy before an eventual total
324 loss of activity.

325 Unexpectedly, the myogenic component, related to the spontaneous activity of the vessel
326 wall's smooth muscle cells ²¹, decreased throughout the recovery period in all groups, with lower
327 values observed in those with obesity and those with type 2 diabetes alone. This might be explained
328 by the elevated endothelial contribution to total power. Another possible reason may be that the
329 myogenic control of the skin blood perfusion, namely autoregulation, is low under normothermic
330 basal conditions ³⁴; only occurring during high pressure changes such as the venoarteriolar reflex
331 ³⁵. Accordingly, autoregulation may be even less apparent during a supine post-sub-maximal
332 exercise recovery period.

333 Finally, the decrease in the relative contribution of cardiac and respiratory components
334 during recovery reasonably reflected cardiopulmonary unloading during post-exercise recovery.

335 There are several limitations to the present study. Firstly, this study was conducted on
336 patients with type 2 diabetes with poor glycaemic control who were hospitalised. Therefore, these
337 findings might not be extrapolated to those with well-controlled type 2 diabetes. Secondly, one
338 could argue that post-exercise skin blood perfusion is measured after only a short moderate-exercise
339 test. This, however, meets the aim of using the 6MWT, reflecting a standard daily physical activity.
340 Furthermore, it was simple, safe to administer and suitable for clinical practice. However, given
341 that the 6MWT only induced moderate vasodilation, the present results should not be generalized
342 to more intense and/or longer exercise. Thirdly, since skin blood perfusion was recorded in a passive
343 supine position, generalizations to exercise tests involving active recovery protocols cannot be
344 made. Finally, more sensitive, complex signal analysis might have elicited complementary
345 results ^{36,37}.

346 This study provides new insights into the mechanisms that may contribute to the reduction
347 in post-exercise vasodilation in those with diabetic peripheral neuropathy. Indeed, patients with
348 subclinical or confirmed peripheral neuropathy demonstrated impaired endothelial and neurogenic
349 mechanisms. Overall, the clinical implications are of interest, demonstrating that an acute bout of
350 submaximal exercise may be beneficial in preventing or reducing some of the impairment in skin

351 blood perfusion induced by type 2 diabetes and peripheral neuropathy. Further research is needed
352 to explore the effect of different modes of exercise on microvascular function and the underlying
353 mechanisms involved in these patients.

354

355 **Acknowledgments**

356 We thank the Hospital Staff of Avignon who offered the possibility to recruit patients, as well as
357 all of the participants. This work was supported by the Platform 3A, funded by the European
358 Regional Development Fund, the French Ministry of Research, Higher Education and Innovation,
359 the region Provence-Alpes-Côte d'Azur, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban
360 Community of Avignon. English language editing was provided by Dr. Jordan Loader of Uppsala
361 University and proofyourscience.com.

362 *Author contributions:* **C. Reynès:** Patient recruitment, data acquisition, formal analysis, Writing -
363 original draft, Writing – review & editing. **JB. Beaume:** Data acquisition, 6MWT operator. **F.**
364 **Latil-Plat, H. Ennaifer, L. Rocher:** Patients recruitment. **S. Antoine-Jonville:** Writing - review
365 & editing. **A. Vinet:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review
366 & editing. **Y. Knapp:** Conceptualization, Funding acquisition, Formal analysis, Writing - review
367 & editing.

368 **Conflict of interest**

369 None.

References

1. Boulton AJM. The Pathway to Foot Ulceration in Diabetes. *Med Clin North Am.* 2013;97(5):775-790. doi:10.1016/j.mcna.2013.03.007
2. Roustit M, Loader J, Deusenberg C, Baltzis D, Veves A. Endothelial Dysfunction as a Link Between Cardiovascular Risk Factors and Peripheral Neuropathy in Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(9):3401-3408. doi:10.1210/jc.2016-2030
3. Park HS, Yun HM, Jung IM, Lee T. Role of Laser Doppler for the Evaluation of Pedal Microcirculatory Function in Diabetic Neuropathy Patients. *Microcirculation.* 2016;23(1):44-52. doi:10.1111/micc.12254
4. Hu H-F, Hsiu H, Sung C-J, Lee C-H. Combining laser-Doppler flowmetry measurements with spectral analysis to study different microcirculatory effects in human prediabetic and diabetic subjects. *Lasers Med Sci.* 2017;32(2):327-334. doi:10.1007/s10103-016-2117-2
5. Mizeva I, Zharkikh E, Dremin V, et al. Spectral analysis of the blood flow in the foot microvascular bed during thermal testing in patients with diabetes mellitus. *ArXiv170702110 Q-Bio.* Published online July 7, 2017. Accessed May 17, 2019. <http://arxiv.org/abs/1707.02110>
6. Sun P-C, Kuo C-D, Chi L-Y, Lin H-D, Wei S-H, Chen C-S. Microcirculatory vasomotor changes are associated with severity of peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2013;10(3):270-276. doi:10.1177/1479164112465443
7. Colberg SR, Parson HK, Holton DR, Nunnold T, Vinik AI. Cutaneous Blood Flow in Type 2 Diabetic Individuals After an Acute Bout of Maximal Exercise. *Diabetes Care.* 2003;26(6):1883-1888. doi:10.2337/diacare.26.6.1883
8. Høyer C, Sandermann J, Petersen LJ. Randomised Diagnostic Accuracy Study of a Fully Automated Portable Device for Diagnosing Peripheral Arterial Disease by Measuring the Toe-brachial Index. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2013;45(1):57-64. doi:10.1016/j.ejvs.2012.09.022
9. Chawla A, Bhasin G, Chawla R. Validation Of Neuropathy Symptoms Score (NSS) And Neuropathy Disability Score (NDS) In The Clinical Diagnosis Of Peripheral Neuropathy In Middle Aged People With Diabetes. :5.
10. Perkins BA, Grewal J, Ng E, Ngo M, Brill V. Validation of a Novel Point-of-Care Nerve Conduction Device for the Detection of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy. *Diabetes Care.* 2006;29(9):2023-2027. doi:10.2337/dc08-0500
11. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, et al. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. *Diabetes Care.* 2010;33(10):2285-2293. doi:10.2337/dc10-1303
12. ATS Statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):111-117. doi:10.1164/ajrccm.166.1.at1102

13. Troosters T, Gosselink R, Decramer M. Six minute walking distance in healthy elderly subjects. :5.
14. Gellish RL, Goslin BR, Olson RE, McDONALD A, Russi GD, Moudgil VK. Longitudinal Modeling of the Relationship between Age and Maximal Heart Rate: *Med Sci Sports Exerc*. Published online May 2007:822-829. doi:10.1097/mss.0b013e31803349c6
15. Mahé G, Haj-Yassin F, Rousseau P, et al. Distance between laser head and skin does not influence skin blood flow values recorded by laser speckle imaging. *Microvasc Res*. 2011;82(3):439-442. doi:10.1016/j.mvr.2011.06.014
16. O'Doherty J, McNamara P, Clancy NT, Enfield JG, Leahy MJ. Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J Biomed Opt*. 2009;14(3):034025. doi:10.1117/1.3149863
17. Bracic M, Stefanovska A. Wavelet-based Analysis of Human Blood-flow Dynamics. *Flow Dyn*:17.
18. Iatsenko D, McClintock PVE, Stefanovska A. Linear and synchrosqueezed time–frequency representations revisited: Overview, standards of use, resolution, reconstruction, concentration, and algorithms. *Digit Signal Process*. 2015;42:1-26. doi:10.1016/j.dsp.2015.03.004
19. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, Kirkebøen KA. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc Res*. 2006;72(3):120-127. doi:10.1016/j.mvr.2006.05.006
20. Kvernmo HD, Stefanovska A, Bracic M, Kirkebøen KA, Kvernebo K. Spectral Analysis of the Laser Doppler Perfusion Signal in Human Skin before and after Exercise. *Microvasc Res*. 1998;56(3):173-182. doi:10.1006/mvre.1998.2108
21. Stefanovska A, Bracic M, Kvernmo HD. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1999;46(10):1230-1239. doi:10.1109/10.790500
22. Reynès C, Vinet A, Maltinti O, Knapp Y. Minimizing the duration of laser Doppler flowmetry recordings while maintaining wavelet analysis quality: A methodological study. *Microvasc Res*. 2020;131:104034. doi:10.1016/j.mvr.2020.104034
23. Bandrivskyy A, Bernjak A, McClintock P, Stefanovska A. Wavelet Phase Coherence Analysis: Application to Skin Temperature and Blood Flow. *Cardiovasc Eng*. 2004;4(1):89-93. doi:10.1023/B:CARE.0000025126.63253.43
24. Miâdi-Messaoud H, Chouchane A, Ben HB, Debbabi H, Ben-Jebria A, Tabka Z. Six-Minute Walk Test Improved Forearm Skin Blood Flow in Tunisian Obese Women. *Obesity*. 20(9):1773-1779. doi:10.1038/oby.2011.174
25. Rossi M, Santoro G, Maurizio S, Carpi A. Spectral Analysis of Skin Blood Flowmotion Before and After Exercise in Healthy Trained and in Sedentary Subjects. *Int J Sports Med*. 2006;27(7):540-545. doi:10.1055/s-2005-865825

26. Potočnik N, Lenasi H. The responses of glabrous and nonglabrous skin microcirculation to graded dynamic exercise and its recovery. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016;64(1):65-75. doi:10.3233/CH-162045
27. Roustit M, Cracowski J-L. Non-invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight Into Methods. *Microcirculation.* 2012;19(1):47-64. doi:https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x
28. IJzerman TH, Schaper NC, Melai Tom, Meijer K, Willems PJB, Savelberg HHCM. Lower extremity muscle strength is reduced in people with type 2 diabetes, with and without polyneuropathy, and is associated with impaired mobility and reduced quality of life. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;95(3):345-351. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.026
29. Sharma S, Schaper N, Rayman G. Microangiopathy: Is it relevant to wound healing in diabetic foot disease? *Diabetes Metab Res Rev.* 2020;36(S1):e3244. doi:https://doi.org/10.1002/dmrr.3244
30. Walløe L. Arterio-venous anastomoses in the human skin and their role in temperature control. *Temp Multidiscip Biomed J.* 2015;3(1):92-103. doi:10.1080/23328940.2015.1088502
31. Journeay WS, Reardon FD, Martin CR, Kenny GP. Control of cutaneous vascular conductance and sweating during recovery from dynamic exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2004;96(6):2207-2212. doi:10.1152/jappphysiol.01201.2003
32. Green DJ, Carter HH, Fitzsimons MG, Cable NT, Thijssen DHJ, Naylor LH. Obligatory role of hyperaemia and shear stress in microvascular adaptation to repeated heating in humans. *J Physiol.* 2010;588(9):1571-1577. doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.186965
33. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol.* 2004;561(1):1-25. doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068197
34. Cracowski J-L, Roustit M. Human Skin Microcirculation. In: *Comprehensive Physiology.* American Cancer Society; 2020:1105-1154. doi:10.1002/cphy.c190008
35. Vissing SF, Secher NH, Victor RG. Mechanisms of cutaneous vasoconstriction during upright posture. *Acta Physiol Scand.* 1997;159(2):131-138. doi:10.1046/j.1365-201X.1997.573344000.x
36. Klonizakis M, Humeau-Heurtier A. Multifractal analysis of laser Doppler flowmetry signals before and after arm-cranking exercise in an older healthy population: Benefits of arm-cranking exercise: A LDF multifractal analysis. *Med Phys.* 2013;40(2):020702. doi:10.1118/1.4774362
37. Silva H, Ferreira HA, Rocha C, Monteiro Rodrigues L. Texture Analysis is a Useful Tool to Assess the Complexity Profile of Microcirculatory Blood Flow. *Appl Sci.* 2020;10(3):911. doi:10.3390/app10030911

Tables

Table 1. Clinical characteristics and performance variables of the participants.

	Controls (n= 16)	Obesity (n= 22)	T2DM (n= 16)	T2DM with subclinical-DPN (n= 15)	T2DM with confirmed-DPN (n= 17)
Women / Men	10 / 6	13 / 9	7 / 9	4 / 11	4 / 13
Age (years)	57.5 ± 7.9	53.9 ± 5.9	54.6 ± 8.9	58.9 ± 7.9	59.4 ± 6.1
BMI (kg/m ²)	23.6 ± 1.8	32.0 ± 3.6 *	30.0 ± 5.1 *	29.5 ± 4.0 *	32.4 ± 4.8 *
SBP (mmHg)	124.8 ± 15.0	127.9 ± 17.8	126.5 ± 10.8	127.4 ± 10.2	125.4 ± 14.4
DBP (mmHg)	75.7 ± 11.0	81.2 ± 12.3	79.5 ± 10.7	79.0 ± 11.4	77.0 ± 10.4
HR rest (bpm)	70.1 ± 13.5	61.0 ± 5.7	74.5 ± 11.6 †	72.3 ± 9.4 †	75.6 ± 11.7 †
Diabetes duration (years)	-	-	14.1 ± 9.1	15.0 ± 7.5	14.1 ± 9.0
Retinopathy	-	-	6	4	4
Nephropathy	-	-	8	4	7
CAN	-	-	2	3	5
Biological data					
HbA1c (%)	-	5.4 ± 0.3	8.8 ± 1.3 †	8.8 ± 1.0 †	8.4 ± 0.8 †
Triglycerides (mmol/L)	-	1.4 ± 0.6	2.0 ± 0.9	1.8 ± 0.8	1.9 ± 1.0
Total cholesterol (mmol/L)	-	5.5 ± 0.7	4.2 ± 0.8 ††	3.6 ± 0.6 ††	4.1 ± 1.3 ††
HDL (mmol/L)	-	1.4 ± 0.4	1.0 ± 0.2 ††	1.0 ± 0.2 ††	1.1 ± 0.3 ††
LDL (mmol/L)	-	4.0 ± 0.7	2.8 ± 0.7 ††	2.1 ± 0.6 ††	2.6 ± 1.2 ††
Fibrinogen (g/L)	-	3.7 ± 0.5	3.8 ± 0.7	3.7 ± 0.8	4.4 ± 0.9 †
hs-CRP (mg/L)	-	3.1 ± 2.9	3.3 ± 3.1	3.1 ± 4.9	3.7 ± 4.0
Medications					
OHM	-	-	6	6	4
Insulin injection	-	-	1	1	3
OHM + insulin	-	-	7	8	10
Anti-hypertensive	-	-	8	9	14
Dyslipidaemia	-	-	9	10	13
Neuropathic pain	-	-	1	0	2
6MWT performance					
Walking distance (m)	621.6 ± 65.9	525.1 ± 67.7 *	419.5 ± 62.3 *†	433.5 ± 71.1 *†	438.2 ± 103.5 *†
Predicted distance (%)	106.5 ± 13.5	94.3 ± 12.8	77.9 ± 17.4 *†	82.0 ± 14.4 *	84.5 ± 19.4 *
Maximal theoretical HR (%)	78.3 ± 19.2	71.1 ± 12.5	68.1 ± 12.4	63.6 ± 12.1	70.8 ± 16.3

Data shown as mean ± SD. * p<0.05 vs Controls; † p<0.05 vs Obesity; †† p<0.01 vs obesity

DPN denotes diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; CAN, cardiac autonomic neuropathy; HbA1c, glycated haemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; OHM, oral hypoglycaemic medication; 6MWT, six-minute walking test.

Table 2. Absolute value of the spectral variables at rest and during recovery in each group.

		Controls	Obesity	T2DM	T2DM with subclinical-DPN	T2DM with confirmed-DPN
Total power	REST	1.39 ± 1.36	0.74 ± 0.74	1.18 ± 1.46	1.81 ± 1.67 ^{† ‡}	0.66 ± 0.44
	Recovery	11.00 ± 9.70	11.27 ± 9.51	4.63 ± 3.76	7.91 ± 9.92	3.95 ± 3.98 [†]
Endothelial NOi	REST	1.51 ± 1.37	0.79 ± 0.73	0.78 ± 0.67	0.88 ± 0.82	0.64 ± 0.61 [*]
	Recovery	37.86 ± 28.73	60.15 ± 50.61	21.87 ± 21.11 [†]	37.45 ± 44.21	20.24 ± 22.75 [†]
Endothelial NOd	REST	1.65 ± 1.58	0.80 ± 0.71	1.21 ± 1.13	1.42 ± 1.39	0.58 ± 0.51 [*]
	Recovery	26.34 ± 21.79	25.39 ± 20.75	11.12 ± 12.09	23.60 ± 32.04	8.44 ± 9.87
Neurogenic	REST	1.72 ± 1.79	1.13 ± 1.26	1.46 ± 1.84	2.34 ± 1.98 [‡]	0.79 ± 0.60
	Recovery	3.40 ± 3.21	1.86 ± 2.01	1.58 ± 1.72	2.32 ± 3.19	1.01 ± 0.98 [*]
Myogenic	REST	1.24 ± 1.46	0.57 ± 0.49	1.56 ± 2.81	1.84 ± 2.03	0.64 ± 0.38
	Recovery	2.20 ± 2.48	0.66 ± 0.87	0.91 ± 0.97	0.88 ± 1.06	0.61 ± 0.65 [*]
Respiratory	REST	0.84 ± 1.38	0.22 ± 0.17	1.05 ± 1.69	1.70 ± 2.07 [†]	0.63 ± 0.70
	Recovery	1.83 ± 3.72	0.39 ± 0.48	1.03 ± 1.19	0.94 ± 1.38	0.72 ± 0.87
Cardiac	REST	0.78 ± 1.27	0.32 ± 0.20	0.73 ± 1.00	1.33 ± 2.08	0.52 ± 0.50
	Recovery	1.41 ± 2.59	0.76 ± 1.00	0.72 ± 0.85	0.75 ± 1.11	0.58 ± 0.56

Data shown as mean ± SD. * $p < 0.05$ vs Controls; [†] $p < 0.05$ vs Obesity; [‡] $p < 0.05$ vs T2DM with confirmed-DPN

T2DMM denotes type 2 diabetes; DPN, diabetic peripheral neuropathy; NOi, nitric oxide-independent; NOd, nitric oxide-dependent.

Figures

Figure 1. (a) Skin blood perfusion measured using laser speckle contrast imaging at rest in each group and (b) the kinetics during recovery. Data were presented as mean \pm SD. * $p < 0.05$ controls vs T2DM; *** $p < 0.01$ all groups vs T2DM with confirmed DPN; †† $p < 0.001$ Time effect.

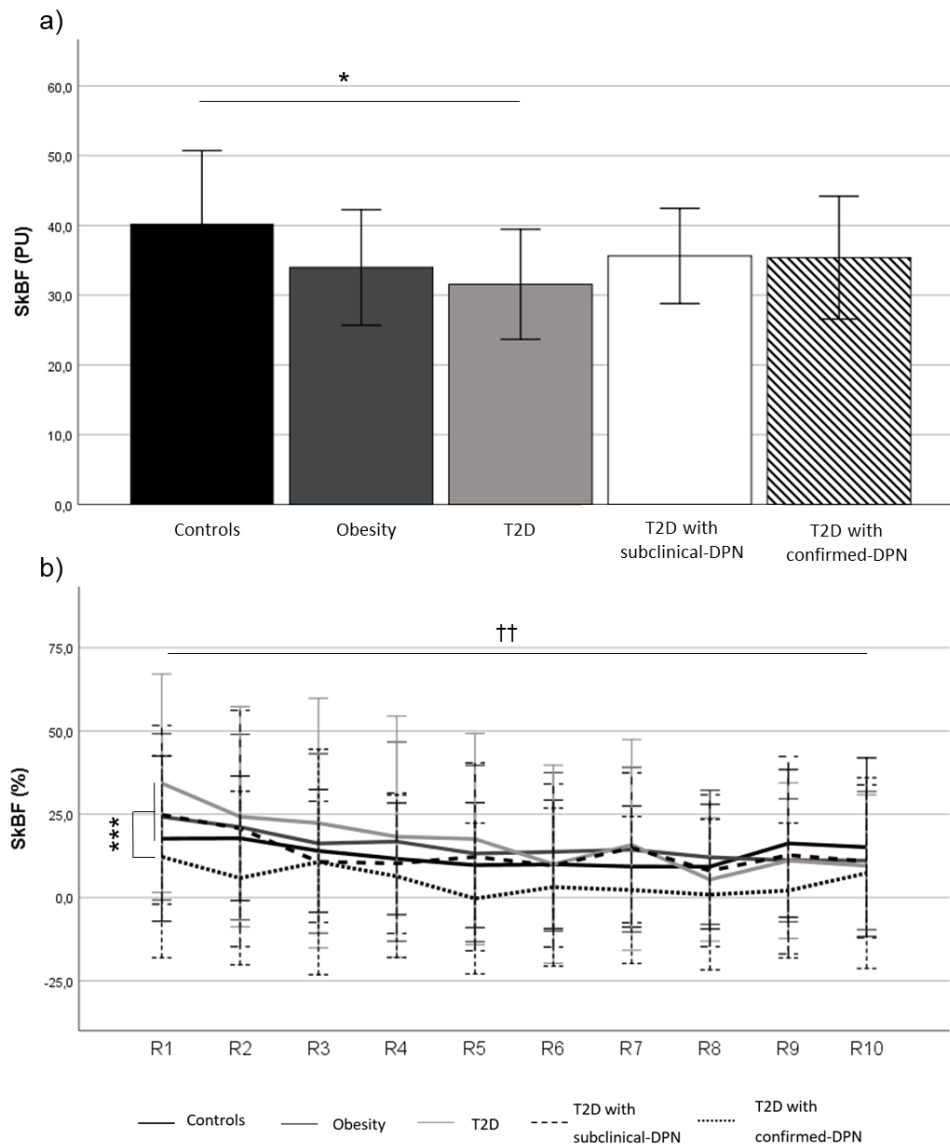
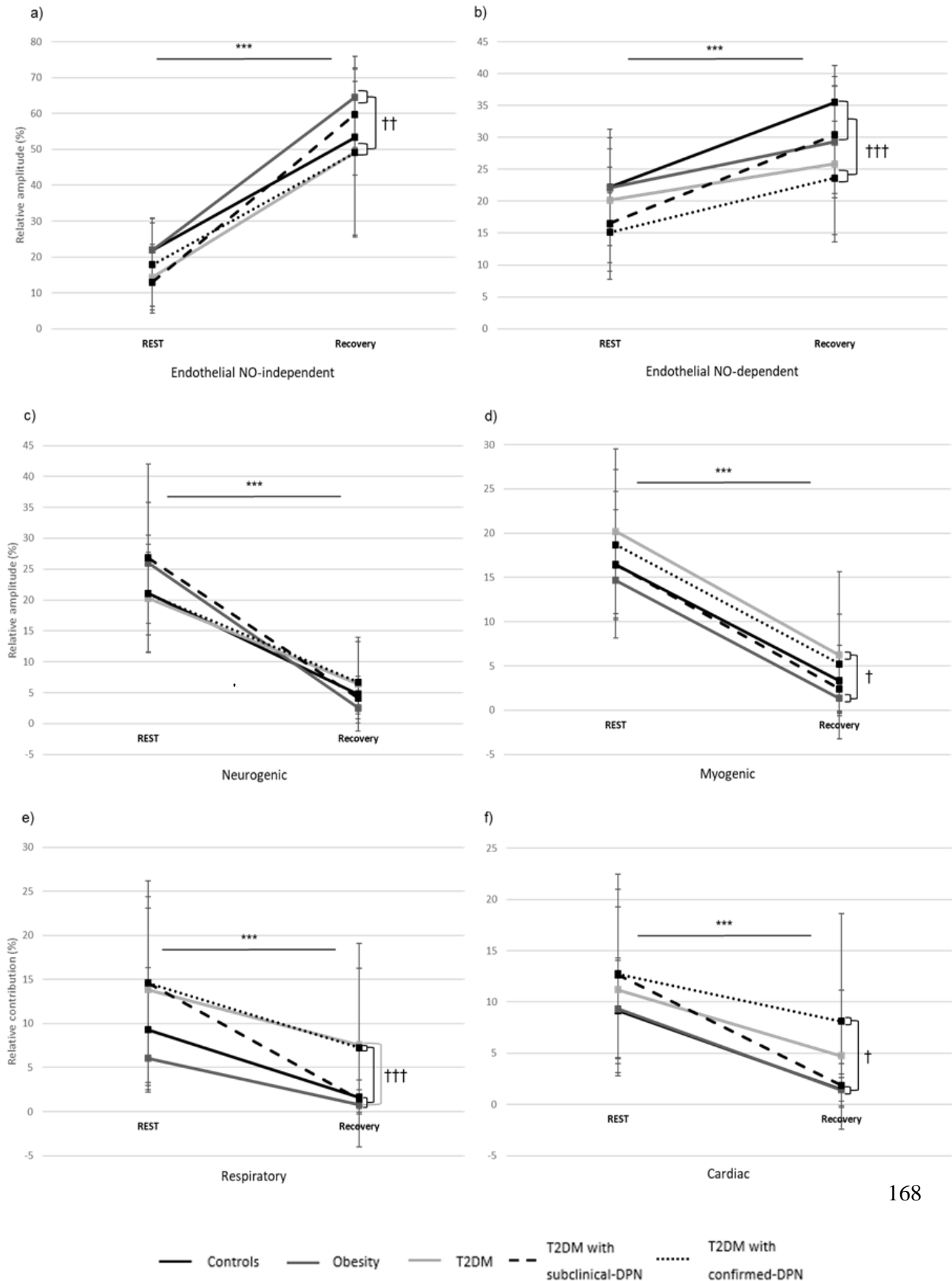




Figure 2: The relative contribution of each component at rest and recovery. ***Time effect: $p < 0.001$; † Group effect: $p < 0.05$; †† Group effect: $p < 0.01$; ††† Group effect: $p < 0.001$; ‡ Group x Time $p = 0.05$.



3. Étude 3:

Mechanisms of venoarteriolar reflex during foot lowering in type 2 diabetes with or without peripheral neuropathy

Les mécanismes du réflexe veino-artériolaire pendant la déclivité du pied chez les diabétiques de type 2 avec ou sans neuropathie périphérique



Original article

Mechanisms of venoarteriolar reflex during foot lowering in type 2 diabetes with or without peripheral neuropathy.

Reynès C.¹, Perez-Martin A.², Ennaifer H.³, Silva H.^{4,5}, Knapp Y.^{1,*} and Vinet A.¹ and *

¹ Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France; agnes.vinet@univ-avignon.fr
² Service Exploration et Médecine Vasculaire, Hôpital Universitaire de Nîmes, IDESP Université de Montpellier France; antonia.perez.martin@chu-nimes.fr
³ Service endocrinologie et maladies métaboliques, Centre hospitalier Henri Duffaut, Avignon, France; ennaifer.houda@ch-avignon.fr
⁴ CBIOS - Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal; henrique.silva@ulusofona.pt
⁵ Pharmacol. Sc Depart - Universidade de Lisboa, Faculty of Pharmacy, Lisboa, Portugal; henrique.silva@ulusofona.pt
* Correspondence: agnes.vinet@univ-avignon.fr; yannick.knapp@univ-avignon.fr

En cours de révision in Microcirculation in Health and Disease, special issue of Biology

Résumé de l'étude 3

Lors d'un changement de posture, la pression veineuse transmurale est augmentée provoquant le réflexe axonal veino-artériolaire. Ce réflexe entraîne la contraction des artérioles pour limiter l'augmentation de pression dans les capillaires. Il a été beaucoup étudié dans la population DT2 avec NP et présenté comme une des causes de la formation d'œdèmes au niveau des pieds diabétiques. Cependant, les mécanismes impliqués dans le VAR sont encore discutés et les résultats chez les DT2 sont contradictoires.

Le but de cette étude était d'analyser les mécanismes sous-jacents du VAR grâce au flowmotion chez les DT2 avec ou sans NP.

Le flux sanguin cutané a été enregistré pendant 15 minutes au repos et pendant 6 minutes en position déclive du pied droit chez des sujets témoins sains (n=16), chez des personnes en situation de surpoids ou d'obésité (n=22), chez des DT2 sans NP (n=15), chez des DT2 avec NP infraclinique (n=13) et confirmée (n=16). Les sondes LDF ont été placées au niveau dorsal du pied et en dessous de la malléole interne. Les signaux ont subi une décomposition en ondelettes pour analyser les mécanismes de contrôle du flowmotion (endothéliaux NO-indépendant et NO-dépendant, neurogénique, myogénique, respiratoire et cardiaque).

Le flux sanguin cutané était diminué tout au long de la déclivité du pied sur les deux sites de mesure. Cette diminution était réduite chez les DT2 avec NP confirmée par rapport aux DT2 sans NP et aux sujets témoins. Pendant la déclivité du pied, le spectre total était augmenté dans tous les groupes par rapport au repos. La contribution relative des bandes endothéliales était augmentée et celle de la bande myogénique diminuée, sans différence entre les groupes. La contribution neurogénique était diminuée chez les sujets témoins, les personnes obèses et les DT2 sans NP, alors qu'elle était inchangée chez les DT2 avec NP confirmée et augmentée chez les DT2 avec NP infraclinique.

Cette étude démontre une altération du VAR chez les DT2 avec NP confirmée par une altération de la composante neurogénique. Au stade de NP infraclinique, nous avons démontré une suractivation compensatoire de la composante neurogénique.

Original article

Mechanisms of venoarteriolar reflex during foot lowering in type 2 diabetes with or without peripheral neuropathy.

Reynès C.¹, Perez-Martin A.², Ennaifer H.³, Silva H.^{4,5}, Knapp Y.^{1,*} and Vinet A.^{1,*}

¹ Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France; agnes.vinet@univ-avignon.fr

² Service Exploration et Médecine Vasculaire, Hôpital Universitaire de Nîmes, IDESP Université de Montpellier France; antonia.perez.martin@chu-nimes.fr

³ Service endocrinologie et maladies métaboliques, Centre hospitalier Henri Duffaut, Avignon, France; ennaifer.houda@ch-avignon.fr

⁴ CBIOS - Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal; henrique.silva@ulusofona.pt

⁵ Pharmacol. Sc Depart - Universidade de Lisboa, Faculty of Pharmacy, Lisboa, Portugal; henrique.silva@ulusofona.pt

* Correspondence: agnes.vinet@univ-avignon.fr; yannick.knapp@univ-avignon.fr

Abstract: The aim of this study was to investigate the underlying mechanisms of the venoarteriolar reflex (VAR) in type 2 diabetes mellitus (T2DM), with and without peripheral neuropathy. Laser Doppler Flowmetry (LDF) recordings were performed on the medial malleus and dorsal foot skin, before and during foot lowering in healthy controls, in persons with obesity, in those with T2DM, in those with T2DM and subclinical neuropathy, and in those with T2DM and confirmed neuropathy. LDF recordings were analysed with the wavelet transform to evaluate mechanisms controlling flowmotion (i.e. endothelial nitric oxide-independent and -dependent, neurogenic, myogenic, respiratory and cardiac mechanisms). Skin blood perfusion decreased throughout foot lowering at both sites. The decrease was blunted in persons with confirmed neuropathy compared to those with T2DM alone and the controls. During foot lowering, total spectral power increased in all groups compared to rest. The relative contribution of the endothelial bands increased and of the myogenic band decreased, without differences between groups. Neurogenic contribution decreased in controls, in persons with obesity and in those with T2DM, whereas it increased in subclinical- and confirmed neuropathy. In conclusion, this study provides evidence that confirmed neuropathy alters the VAR by an inverting of the neurogenic response to foot lowering.

Keywords: Type 2 diabetes, Peripheral neuropathy, laser-Doppler flowmetry, microcirculation, venoarteriolar reflex

Potential reviewers : Z. Stoyneva : zlatka_stoyneva@yahoo.com ; G. Hodges : ghodges@brocku.ca ; H. Lenasi : helena.lenasi.ml@mf.uni-lj.si

1. Introduction

Postural changes induce arteriolar vasoconstriction in response to an increase in transmural venous pressure in the limbs known as the venoarteriolar reflex (VAR). This acute vascular adaptation to movement limits the increase in hydrostatic pressure exerted upon the peripheral capillaries. It has been shown that the VAR is under local control, mediated by myogenic tone and by non α -adrenergic nerve fibers rather than by local sympathetic innervation [1,2]. More recently, it was found that endothelium nitric oxide-independent agents, as well as Ca^{2+} and voltage-gated K^{+} channels, contribute to the VAR [3,4].

Previous studies reported that skin blood perfusion is impaired during the VAR in persons with type 2 diabetes mellitus (T2DM) with or without peripheral neuropathy, compared to control subjects. This reduction in the vasoconstrictive response was demonstrated in the standing position [5,6], when sitting up [7-9], and in limb-dependent protocols [10,11]. Alterations of the VAR in neuropathy could be associated with swelling, oedema and impairment of wound healing [8]. All of these previous studies used Laser Doppler flowmeter (LDF) as a recording technique, without investigating the underlying mechanisms of skin blood perfusion. Furthermore, the use sensitive signal processing tools such as the wavelet analysis of the LDF signal during the VAR could provide data that explains the mechanistic alterations in diabetic peripheral neuropathy.

Accordingly, the aim of this study was to compare changes in foot skin blood perfusion and flowmotion (via wavelet analysis) between healthy controls, those with obesity and those with T2DM, with or without neuropathy.

2. Materials and Methods

2.1. Participants

The NEUROMICRO trial (NCT03847779) is a clinical study designed to examine flowmotion following different stimuli in persons with T2DM. Eighty-two participants (38 females, 44 males) aged 40-72 years were included in this study after providing their informed written consent. Forty-four of those participants were patients with T2DM; 15 without peripheral neuropathy, 13 with subclinical peripheral neuropathy and 16 with confirmed peripheral neuropathy. Of the other 38 participants, 22 had obesity and were comparable to those with T2DM for body mass index, while the remaining 16 were considered healthy and normal-weight, matched for age and sex to form the control group. All participants without diabetes (i.e. those with obesity and the healthy controls) were normotensive, were not using any medications and had no evidence of cardiopulmonary disease. Patients with T2DM who had a history of ulceration, a toe-brachial index under 0.7 (indicating peripheral vascular disease [15]), or a history of using of vasoactive medications (e.g. calcium channel blockers) were excluded. In order to implement a real-life scenario in this study, patients maintained their quotidian medication (e.g. for high blood pressure, dyslipidaemia, glycaemic control or pain treatments) throughout the study (Table 1).

All participants with T2DM were also screened for retinopathy, nephropathy, cardiac autonomic neuropathy. Retinopathy was evaluated by dilated fundus examination. Nephropathy was defined as a glomerular filtration rate under 90 mL/min/1.73 m² according to the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation [16]. Cardiac autonomic neuropathy was evaluated with the three Ewing Tests: 1) the heart rate response to deep breathing (E/I ratio); 2) the heart rate response to standing (30s/15s ratio); and 3) sympathetic neural function via the blood pressure response to standing.

Peripheral neuropathy was detected by a Neuropathy Symptom Score questionnaire >3 [17]. Briefly, the presence of peripheral neuropathy was based on alteration of large and/or small nerve fibres. Large nerve fibres were tested via sural nerve conduction using a DPNCheck device (Neurometrix, Waltham, MA). Abnormal nerve conduction was considered when an amplitude of $\leq 5\mu V$ or a velocity of $\leq 41m/s$ was reached [18]. An alteration of the small nerve fibres was considered when a score under three for hot or cold sensibility was obtained or if a thermal pain threshold was not reached between 35-45°C when being assessed with NerveCheck (Phi Med Europe S.L., Barcelona, Spain). In accordance with the Toronto Consensus [19], peripheral neuropathy was confirmed when signs and symptoms were detected. In absence of symptoms, but in presence of signs, peripheral neuropathy was defined as subclinical.

2.2. Protocol

All participants were instructed to present to their assessment at least two hours fasted and to abstain from caffeine and smoking. They were also instructed to avoid strenuous physical activity in the 24 hours prior to their assessment. Blood samples were collected for HbA1C assessment in all participants except for the healthy controls.

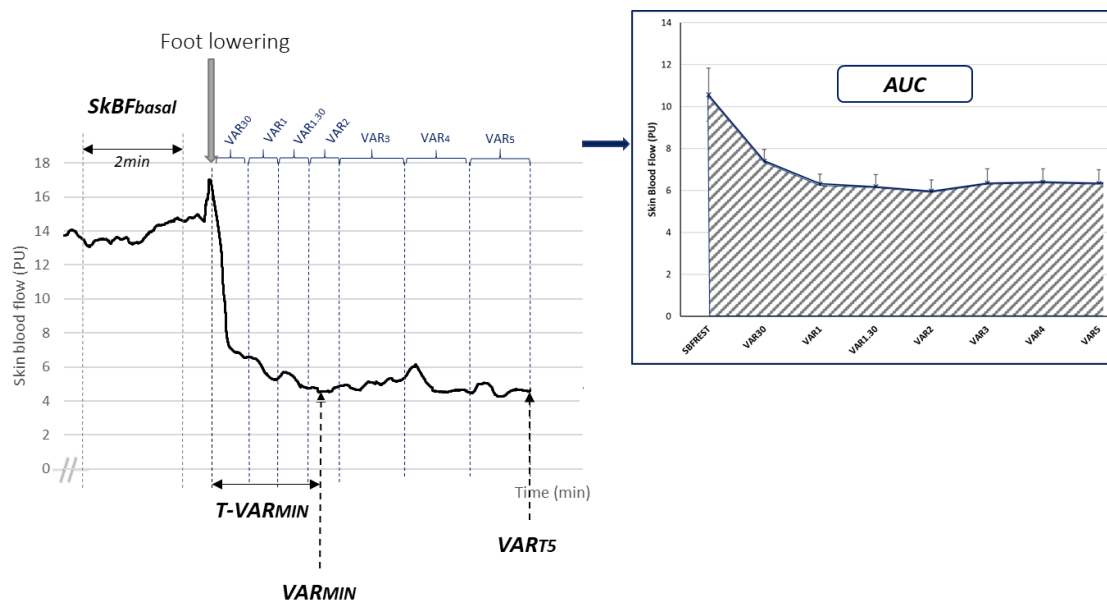
All microvascular assessments were performed in a quiet, temperature-controlled room (22–25°C) with minimal external disturbances, while the participant remained in a supine position. Skin blood perfusion was assessed using a laser Doppler flowmeter system (Periflux 5000, Perimed, Sweden) coupled with two thermostatic probes with a wavelength of 780 nm and an effective surface of 0.95 cm² (PF 481, Perimed, Stockholm, Sweden). On intact skin of the right foot, one probe was placed under medial malleolus and the other on dorsal surface of the foot between the heads of the second and third metatarsals (supplemental data). Based on the Doppler principle, the probe emits and detects light partially backscattered in the tissues by moving blood cells, causing a change in frequency. The proportion of non-shifted to shifted light is related to the number of moving cells and the velocity of these cells, and is a characteristic of tissue perfusion. The typical depth of the measurement is 1–1.5 mm, evaluating non-nutritive skin blood perfusion. LDF recorded continuously at frequency of 32 Hz using an interfaced computer with data acquisition software (Perisoft, Perimed, Stockholm, Sweden) and skin blood perfusion were expressed as conventional perfusion units (PU).

Prior to start of the skin blood perfusion assessment, the feet were immobilized with a vacuum cushion. After an acclimatization period of 20 minutes, basal skin blood perfusion was recorded for 15 minutes in a supine position with both legs resting fully extended on the bed. Participants were then asked to lower their right foot off the bed by flexion of the knee, while still lying in a supine position. The right foot remained in this lower position five minutes. Brachial artery blood pressure was monitored at beginning and at the end of basal period, and after the lowering foot period using a digital sphygmomanometer (OMRON 907, Omron Healthcare, Kyoto, Japan).

2.3. Data Analysis

An LDF recording was considered acceptable when there was a stable curve in the total backscattering signal. Basal skin blood perfusion is the most stable two minutes into the resting period. Indices of the VAR were considered firstly as kinetics, with changes in skin blood perfusion averaged every 30 seconds during the two first minutes after postural change, and every minute thereafter until the fifth minute (i.e. VAR₃₀, VAR₁, VAR_{1.30}, VAR₂, VAR₃, VAR₄ and VAR₅). Based on these kinetics, the area under the curve (AUC) was also calculated. Secondly, after averaging skin blood perfusion every 20 seconds, the minimal perfusion during the foot lowering period (VAR_{MIN}) and the time to reach VAR_{MIN} (T-VAR_{MIN}), as well as the percentage reduction from rest (VAR_{MIN}%) were assessed (Figure 1).

Figure 1. Representation of analyzed parameters. SkBF, Skin Blood Flow; AUC, Area under the Curve



Continuous Wavelet Transforms based on early work by Bracic and Stefanovska [20], as well as subsequent research [13,14,21,22], were computed from the valid temporal data across the full length of the recording [23], which lasted 45 minutes. Spectral analysis was performed for 15 minutes from the end of the acclimatization period and, immediately, for another five minutes from the beginning of the foot lowering period. As a consequence of this procedure, data were not impacted by the cone of influence exerted by the wavelet transform [21]. The time-averaged spectrums were split into the following six frequency bands [24]: Band VI, Endothelial nitric oxide-independent mechanisms [0.005–0.0095 Hz]; Band V, Endothelial nitric oxide-dependent mechanisms [0.0095–0.021 Hz]; Band IV, Neurogenic mechanisms [0.021–0.052 Hz]; Band III, Myogenic mechanisms [0.052–0.145 Hz]; Band II, Respiratory mechanisms [0.145–0.6 Hz]; and Band I, Cardiac mechanisms [0.6–1.6 Hz]. Finally, the absolute median value of the total spectral power and of each band was computed; and the relative contribution (i.e. the median level of a particular frequency band divided by the median level of the total spectral power) was calculated for the rest and recovery periods across both skin sites.

2.4. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using SPSS® (version 22.0, IBM Corp, Armonk, NY). Variables were expressed as mean ± standard error of the mean. A general Linear Model was used to compare variables between groups and a linear mixed model was used for the kinetics analysis, as well as the comparison between the rest and foot lowering period. In the event of a significant group interaction, pairwise comparisons with Bonferoni post-hoc tests were used. According to the results of the correlation matrix between skin blood perfusion and potential cofactors, the general linear model and the linear mixed model were adjusted to skin temperature or to basal skin blood perfusion and/or age. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Participant characteristics

The clinical characteristics of the participants are reported in Table 1. All groups were comparable in terms of sex and blood pressure with well-controlled values. Body mass index did not differ between those with obesity or T2DM, or those with T2DM and subclinical or confirmed neuropathy. As expected, however, body mass index was lower in the controls ($p < 0.001$). The group with confirmed neuropathy was older than those with obesity and those with T2DM alone. The duration of T2DM was not significantly different between the three groups with diabetes. As expected, HbA1c levels were higher in those with T2DM versus those with obesity ($p < 0.001$). The proportion of microvascular complications was not different between the groups with T2DM.

Table 1. Clinical characteristics of the participants

	Controls (n= 16)	Obesity (n= 22)	T2DM (n= 15)	T2DM with subclinical-DPN (n= 13)	T2DM with confirmed-DPN (n= 16)
Women / Men	10 / 6	13 / 9	7 / 8	3 / 10	5 / 11
Age (years)	57.5 ± 1.9	53.9 ± 1.2	53.4 ± 1.9	59.9 ± 2.0	59.9 ± 1.5 # ‡
BMI (Kg/m²)	23.5 ± 0.4	32.0 ± 0.8 ***	30.2 ± 1.3 ***	29.0 ± 1.0 ***	33.2 ± 1.5 ***
SBP (mmHg)	124.8 ± 4.0	127.9 ± 4.0	125.5 ± 2.8	128.5 ± 2.8	126.3 ± 4.0
DBP (mmHg)	75.7 ± 2.9	81.2 ± 2.7	79.4 ± 2.9	79.5 ± 3.3	76.1 ± 2.4
HR rest (bpm)	70.0 ± 3.7	60.9 ± 1.3	75.2 ± 3.2 ###	72.3 ± 2.7 ###	74.9 ± 2.9 ###
HbA1c (%)	-	5.4 ± 0.1	8.8 ± 0.3 ###	8.7 ± 0.3 ###	8.4 ± 0.2 ###
hs-CRP (mg/L)		3.1 ± 0.7	3.4 ± 0.8	3.2 ± 1.9	4.0 ± 1.0
Fibrinogen (g/L)		3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Diabetes duration (years)	-	-	12.7 ± 2.1	14.5 ± 2.1	14.3 ± 2.3
Retinopathy	-	-	5	3	4
Nephropathy	-	-	7	4	6
CAN	-	-	2	3	4
Medications					
OHM	-	-	6	6	4
Insulin injection	-	-	1	1	3
OHM + insulin	-	-	6	6	9
Anti-hypertensive	-	-	7	8	14
Dyslipidaemia	-	-	9	8	12
Neuropathic pain	-	-	1	0	1

Data shown as mean ± SEM. *** p<0.001 vs Controls; #p<0.05 vs Obesity; ###p<0.001 vs Obesity, ‡p<0.05 vs T2DM DPN, diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes mellitus; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate; HbA1c, glycated haemoglobin; hs-CRP, high sensitivity C-reactive protein; CAN, cardiac autonomic neuropathy ; OHM, oral hypoglycaemic medication.

3.2. Microvascular assessments

There was no change in heart rate and blood pressure during the VAR, whatever the group. Microvascular data for the medial malleus at rest and during the VAR are reported in Table 2. There was no difference in basal skin blood perfusion between groups in the supine position. AUC, VAR_{MIN}, expressed either in PU or %, were not different between groups. Same results were obtained on dorsal surface of the foot (data not shown). All results were preserved after model adjustment to basal skin temperature, basal skin blood perfusion or age.

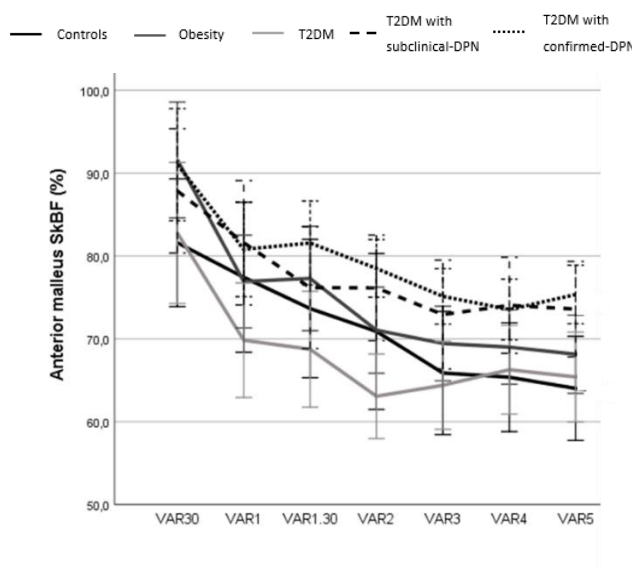
Regardless of the skin site and the group, skin blood perfusion at VAR₃₀ was lower than basal skin blood perfusion. Skin blood perfusion kinetics expressed as a percentage of basal skin blood perfusion demonstrated a significant decrease throughout the foot lowering period (p<0.001; Figure 2 and Figure S1) at both skin sites. At the medial malleus, a group effect was found with a blunted decrease in skin blood perfusion in those with confirmed neuropathy compared to controls and those with T2DM (p<0.01). After adjustment for basal skin temperature and/or age, this blunted decrease remained across both skin sites.

Table 2. Microcirculation variables at rest and during the venoarteriolar reflex in each group

	Controls	Obesity	T2DM	T2DM with subclinical-DPN	T2DM with confirmed-DPN	GLM p-value
Basal skin blood perfusion (PU)	10.3 ± 1.8	10.4 ± 1.5	10.4 ± 1.3	8.6 ± 1.0	9.1 ± 1.0	ns
VAR_{MIN} (PU)	4.8 ± 0.6	5.2 ± 0.4	5.2 ± 0.5	5.2 ± 0.6	5.6 ± 0.5	ns
VAR_{MIN} (%)	-44.7 ± 5.6	-39.9 ± 4.7	-44.8 ± 5.5	-36.2 ± 5.6	-35.4 ± 3.0	ns
T-VAR_{MIN} (sec)	143.4 ± 24.4	126.9 ± 17.5	102.9 ± 19.8	92.1 ± 19.4	84.6 ± 16.3	ns
AUC (PU.min)	28.5 ± 3.5	30.3 ± 2.5	30.2 ± 2.7	29.6 ± 3.2	32.2 ± 2.9	ns

Data shown as mean ± SEM. ns, non-significant; GLM, General linear model; DPN, diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes mellitus; AUC, area under the curve.

Figure 2. Skin blood perfusion kinetics during foot lowering at the medial malleus in each group. *** Time effect p<0.001; **Group effect: confirmed-DPN vs controls and T2DM p<0.01; interaction p=1. DPN, diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes mellitus; SkBF, skin blood flow.



3.3. Spectral Analysis

At rest, irrespective of the skin site, there was no difference between the groups for total spectral power or for each frequency band. At the dorsal foot, the relative contribution of the respiratory band was lower in participants with obesity than in those with subclinical neuropathy or confirmed neuropathy (respectively 6.44 ± 0.85 ; 15.14 ± 4.82 and $14.02 \pm 2.54\%$; $p < 0.05$). At the medial malleus, the relative contribution of the cardiac band was lower in those with obesity and confirmed neuropathy compared to controls ($p < 0.05$). All other bands were similar between each group.

After foot lowering, the total spectral power did not change significantly in the dorsal foot, whereas, it increased in the medial malleus without difference between groups. This increase was supported by a significant increase in the absolute values of the two endothelial and neurogenic bands, whatever the skin site ($p < 0.01$).

The relative contribution of the endothelial bands increased significantly irrespective of the skin site without difference between groups (Figure 3a and 3b; and Figure S2). Myogenic and cardiac contributions decreased significantly at both skin sites without difference between groups (Figure 3d and 3f; and Figure S2). At the dorsal foot, there was no time or group effect in the neurogenic band, but there was a decrease in the respiratory band across all groups, with the greatest decrease occurring in those with T2DM (Figure S2; $p < 0.05$). At the medial malleus, there was no change in the respiratory band (Figure 3e). There was a slight group by time interaction in the neurogenic band with an increase in those with subclinical and confirmed neuropathy during the foot lowering period. However, the contribution of the neurogenic band decreased in the three other groups (Figure 3c; $p = 0.07$).

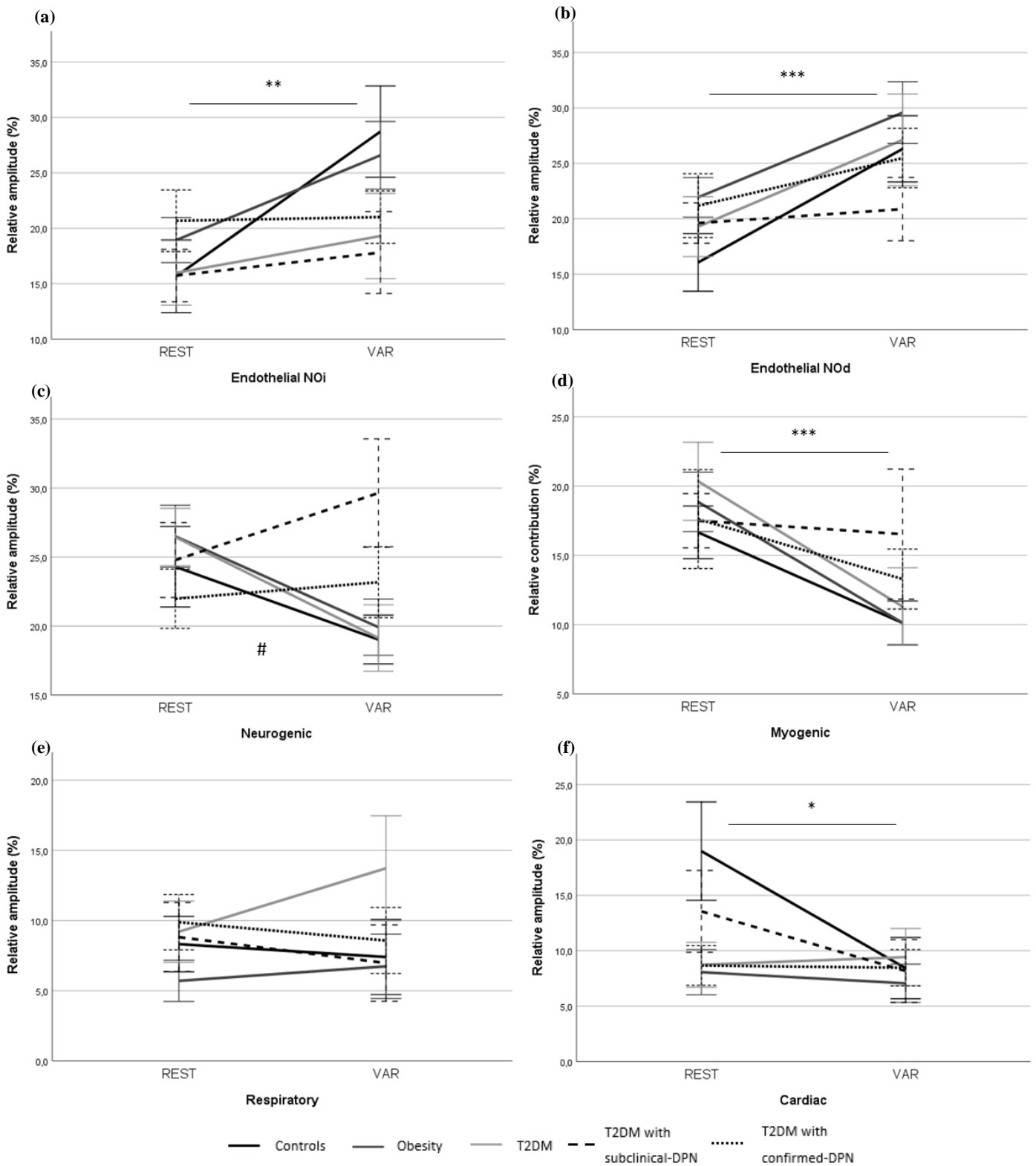


Figure 3. The relative contribution of each component at rest and during the foot lowering period at the medial malleus. *** Time effect $p < 0.001$; # Time \times Group $p = 0.07$. DPN denotes diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

4. Discussion

After confirming findings from previous research that the microvascular response to foot lowering is impaired in confirmed neuropathy, this study explored the underlying flowmotion pattern, providing evidence that neurogenic activity increases during this blunted response in those with subclinical and confirmed neuropathy.

The foot lowering protocol used in this study evoked a small VAR compared to venous congestion or standing protocols [10,11,25]. However, it induced a decrease in perfusion at both skin sites (i.e. the dorsal foot and the medial malleus). The decrease in skin blood perfusion was moderate at around 30% in the dorsal foot and 40% in the medial malleus. Nevertheless, this stimulus was able to discriminate between groups, revealing a blunted decrease in those with confirmed-neuropathy, as compared to controls and persons with T2DM; ultimately, suggesting a reduction in the vasoconstriction capacity of these participants. Importantly, the adjustments made for age did not change the result as previously reported in healthy persons [26]. Inflammatory status assessed by concentrations of fibrinogen and hs-CRP did not correlate with the findings in this study. Additionally, the concentrations of these biomarkers were not different between groups (not measured in controls), suggesting that inflammation is not responsible for the blunted vasoconstrictive response in confirmed neuropathy. To account for the intrinsic differences between persons with T2DM, who had higher foot temperature, and those without T2DM, the probe was not heated [27]. Thus, results were also adjusted for basal skin temperature. Skin temperature did not impact the VAR as already reported by Davison *et al* [28]. Skin blood perfusion during the VAR did not return to basal levels at the end of the five-minute recording. It must be noted that this recording duration may not have been long enough. Indeed, a return to basal skin blood perfusion is achieved in 10 minutes in healthy persons [7].

The findings of this study, where the VAR was impaired in confirmed neuropathy but preserved in those with T2DM alone and in those with subclinical neuropathy, were not in accordance with previous studies. Indeed, most studies have reported an altered response in those with diabetes. However, when looking at these studies in greater detail, some included persons with T2DM, with or without neuropathy in the same group [12]. Furthermore, patients with foot ulcers or older participants were also included [5,8,10]. In this present study, neuropathy was carefully defined as either subclinical or confirmed using recommendations from the Toronto consensus for clinical studies [19]. Additionally, participants in the obesity group were matched by gender and body mass index to those with T2DM, isolating the effect of T2DM. Therefore, the results of this study suggest that in subclinical neuropathy, the microvascular vasoconstrictive response is preserved before a progressive alteration is established in confirmed neuropathy.

Whether the underlying mechanisms of the VAR are similar in healthy persons and those with T2DM had not been explored previously. We reported an increase in total spectral power during the VAR at the medial malleus in all groups without changes in cardiac and respiratory absolute values. This increase of total power prompted the relative contribution of only low-frequency components to be discussed further.

Myogenic tone has usually been regarded as a major mediating factor in the VAR. Crandall *et al.* have demonstrated that the VAR was controlled by non α -adrenergic nerve fibers and myogenic tone, rather than by local sympathetic innervation [2]. Additionally, Fuji *et al.* identified a role of the Ca^{2+} and voltage-gated K^{+} channels [4]. Unexpectedly, activity in the myogenic band decreased during the VAR at both skin sites in all groups. However, this result was in accordance with findings from Silva *et al.*, in healthy persons [3]. As the VAR is an immediate reflex, the myogenic component may be activated quickly during the first seconds of foot lowering to protect the capillaries from a substantial increase in hydrostatic pressure. Its involvement may then be decreased for the remainder of the evaluation, the extra six minutes necessary to obtain valid wavelet analysis [29]. Alternatively, this reduction in the contribution from the myogenic band might be explained by the substantial increase in the contribution to skin blood perfusion from the endothelial bands, which might override the myogenic mechanisms; reflecting the autoregulation from the vascular smooth muscle cells [13]. Considering this collectively, there may be cross-talk between each spectral component with compensatory phenomena in each band coming to the forefront according to microcirculatory demands.

The two endothelial bands increased in all groups and across both of the skin sites. Indeed, this finding in persons with T2DM extended upon results in healthy persons [3]. These increases may be related to the release of vasodilator substances to increase blood flow, progressively restoring skin blood perfusion to basal conditions.

Finally, there was no time or group effect in the neurogenic band at either skin site. However, a trend for a group by time interaction was noted at the medial malleus ($p=0.07$), indicating a decrease in the neurogenic contribution to skin blood perfusion during the VAR in controls, in those with obesity and in those with T2DM, but an increase in subclinical and confirmed neuropathy. This blunted neurogenic contribution to skin blood perfusion during the VAR may be explained by the short period of sympathetic activation with the rise in transmural pressure after foot lowering, followed by a withdrawal throughout the sustained dependency period [3]. This is the first study to show different responses between neuropathy groups and others showing a dysregulation of sympathetic function in neuropathy. Indeed, the confirmed neuropathy slightly increased activity within the neurogenic band, while the increase was more profound in subclinical neuropathy. This may be due to an over activity in the residual nerves of those with subclinical neuropathy, before total loss. A higher contribution in the neurogenic band may have allowed those with subclinical neuropathy to maintain a normal VAR.

There are several limitations to the present study. First, this study was conducted on hospitalised patients with T2DM and poor glycaemic control. Therefore, the validity of these results may not be extrapolated to patients with well-controlled diabetes. Secondly, skin perfusion was assessed on non-glabrous skin at both sites. As the regulation of skin blood perfusion in non-glabrous and glabrous skin is different, these results might not extend to glabrous skin. Thirdly, LDF recordings were assessed on the right foot only, for technical reasons. A randomization of the foot being assessed would have allowed for the assumption that the two limbs respond in the same way, especially since peripheral neuropathy is known to be symmetrical [30]. Finally, an evaluation of leg oedema or swelling during lowering period might have brought other outcomes to the altered response in T2DM with neuropathy [7].

5. Conclusions

In conclusion, this study confirmed a blunted vascular response during the VAR in non-glabrous skin in those with T2DM and confirmed neuropathy. Extending on this, this study gained new insights into mechanisms underlying this impairment, providing evidence that suggests that the blunted vascular response during the VAR in those with confirmed neuropathy may be explained by alteration in neurogenic control. Further research using more sensitive signal analyses might provide complementary insights into changes in skin blood perfusion mediated by the VAR.

Supplementary Materials:

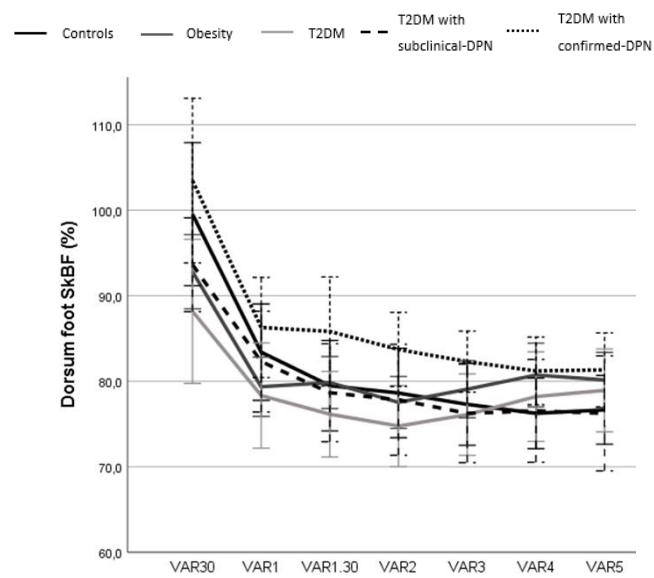


Figure S1. Skin blood perfusion kinetics during foot lowering at the dorsal foot in each group. *** Time effect $p < 0.001$; Group effect: 0.09; interaction: 1. DPN denotes diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes mellitus; SkBF, skin blood flow.

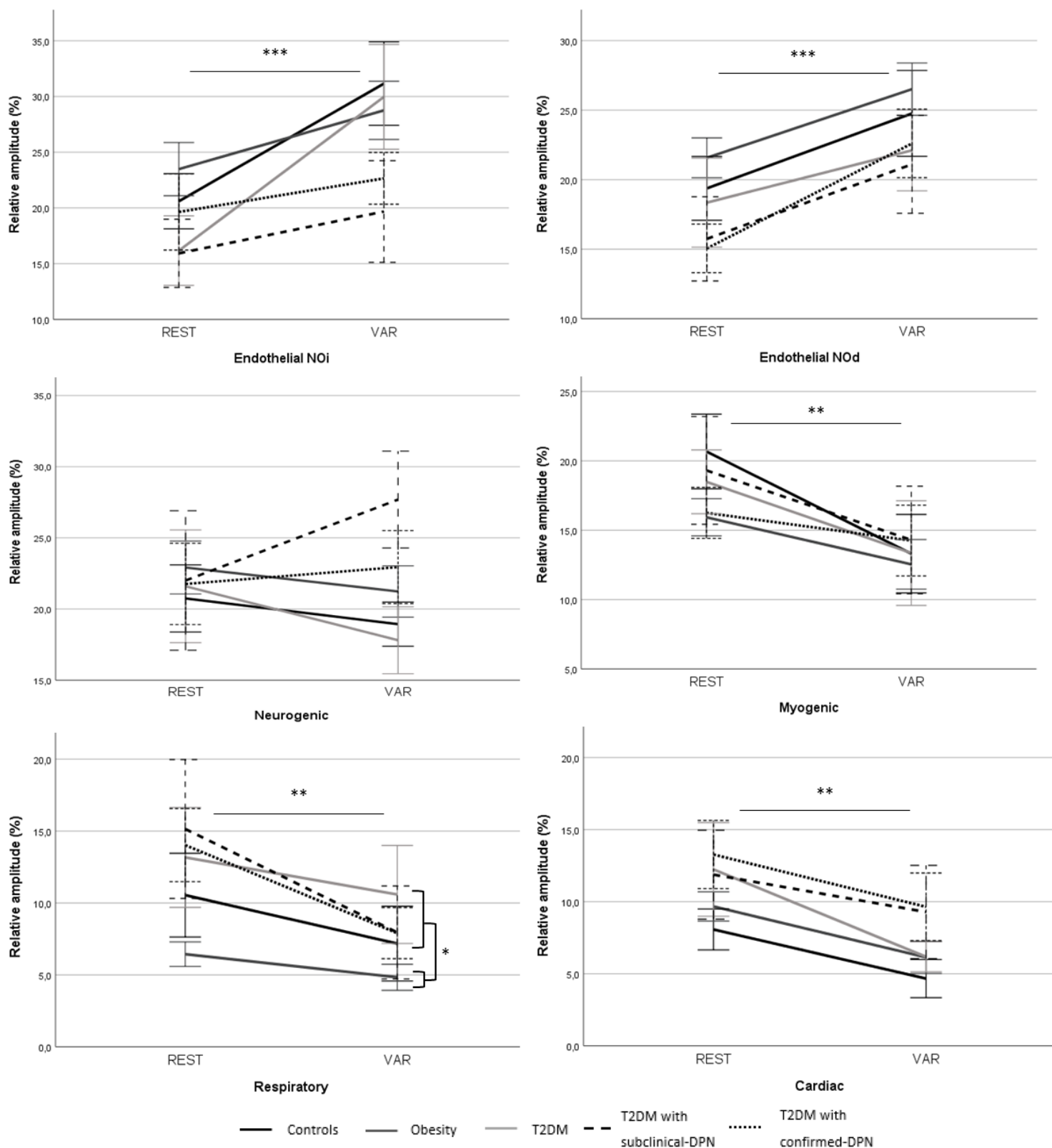


Figure S2. The relative contribution of each component at rest and during foot lowering at the dorsal foot. ***Time effect $p < 0.001$; * Group effect T2DM vs Controls and Obesity $p < 0.05$. DPN, diabetic peripheral neuropathy; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Author Contributions: C. Reynès: Patient recruitment, data acquisition, analysis, interpretation of data, Writing - original draft, Writing - review & editing. A. Perez-Martín: Conception, Writing - review & editing. H. Ennaifer: Patients recruitment. H. Silva: Review & editing. Y. Knapp: Conception, Funding acquisition, Formal analysis, Writing - review & editing. A. Vinet: Conception, interpretation of data, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Ile de France VI-Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (protocol code 2018-A03170-55 approved the 14th of January 2019). NCT03847779.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: We thank the Hospital Staff of Avignon who offered the possibility to recruit patients, as well as all of the participants. English language editing was provided by Dr. Jordan Loader of Uppsala University and proofyourscience.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vissing, S.F.; Secher, N.H.; Victor, R.G. Mechanisms of Cutaneous Vasoconstriction during Upright Posture. *Acta Physiol. Scand.* 1997, 159, 131–138, doi:10.1046/j.1365-201X.1997.573344000.x.
2. Crandall, C.G.; Shibasaki, M.; Yen, T.C. Evidence That the Human Cutaneous Venoarteriolar Response Is Not Mediated by Adrenergic Mechanisms. *J. Physiol.* 2002, 538, 599–605, doi:10.1113/jphysiol.2001.013060.
3. Silva, H.; Ferreira, H.A.; da Silva, H.P.; Monteiro Rodrigues, L. The Venoarteriolar Reflex Significantly Reduces Contralateral Perfusion as Part of the Lower Limb Circulatory Homeostasis in Vivo. *Front. Physiol.* 2018, 9, 1123, doi:10.3389/fphys.2018.01123.
4. Fujii, N.; McGarr, G.W.; McNeely, B.D.; Ichinose, M.; Nishiyasu, T.; Kenny, G.P. KCa and KV Channels Modulate the Venoarteriolar Reflex in Non-Glabrous Human Skin with No Roles of KATP Channels, NOS, and COX. *Eur. J. Pharmacol.* 2020, 866, 172828, doi:10.1016/j.ejphar.2019.172828.
5. Belcaro, G.; Vasdekis, S.; Rulo, A.; Nicolaidis, A.N. Evaluation of Skin Blood Flow and Venoarteriolar Response in Patients with Diabetes and Peripheral Vascular Disease by Laser Doppler Flowmetry. *Angiology* 1989, 40, 953–957, doi:10.1177/000331978904001103.
6. Park, H.S.; Yun, H.M.; Jung, I.M.; Lee, T. Role of Laser Doppler for the Evaluation of Pedal Microcirculatory Function in Diabetic Neuropathy Patients. *Microcirculation* 2016, 23, 44–52, doi:10.1111/micc.12254.
7. Nabuurs-Franssen, H.; Schaper N. The Effect of Polyneuropathy on Foot Microcirculation in Type II Diabetes. *Diabetologia* 2002, 45, 1164–1171, doi:10.1007/s00125-002-0872-z.
8. Rayman, G.; Hassan, A.; Tooke, J.E. Blood Flow in the Skin of the Foot Related to Posture in Diabetes Mellitus. 1986, 292, 4.
9. Stoyneva, Z.; Velcheva, I.; Antonova, N.; Titianova, E.; Koleva, I. Venoarteriolar Reflex Responses in Diabetic Patients. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2017, 65, 57–65, doi:10.3233/CH-15106.
10. Belcaro, G.; Nicolaidis, A.N. The Venoarteriolar Response in Diabetics. *Angiology* 1991, 42, 827–835, doi:10.1177/000331979104201008.
11. Cacciatori, V.; Dellera, A.; Bellavere, F.; Bongiovanni, L.G.; Teatini, F.; Gemma, M.L.; Muggeo, M. Comparative Assessment of Peripheral Sympathetic Function by Postural Vasoconstriction Arteriolar Reflex and Sympathetic Skin Response in NIDDM Patients. *Am. J. Med.* 1997, 102, 365–370, doi:10.1016/S0002-9343(97)00088-0.
12. Iwase, M.; Imoto, H.; Murata, A.; Nakamura, U.; Nohara, S.; Uchizono, Y.; Iino, K.; Iida, M. Altered Postural Regulation of Foot Skin Oxygenation and Blood Flow in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2007, 115, 444–447, doi:10.1055/s-2007-960499.
13. Stefanovska, A.; Bracic, M.; Kvernmo, H.D. Wavelet Analysis of Oscillations in the Peripheral Blood Circulation Measured by Laser Doppler Technique. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1999, 46, 1230–1239, doi:10.1109/10.790500.
14. Kvandal, P.; Landsverk, S.A.; Bernjak, A.; Stefanovska, A.; Kvernmo, H.D.; Kirkebøen, K.A. Low-Frequency Oscillations of the Laser Doppler Perfusion Signal in Human Skin. *Microvasc. Res.* 2006, 72, 120–127, doi:10.1016/j.mvr.2006.05.006.

15. Høyer, C.; Sandermann, J.; Petersen, L.J. Randomised Diagnostic Accuracy Study of a Fully Automated Portable Device for Diagnosing Peripheral Arterial Disease by Measuring the Toe–Brachial Index. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2013, 45, 57–64, doi:10.1016/j.ejvs.2012.09.022.
16. Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Greene, T.; Zhang, Y. (Lucy); Beck, G.J.; Froissart, M.; Hamm, L.L.; Lewis, J.B.; Mauer, M.; Navis, G.J.; et al. Comparative Performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Equations for Estimating GFR Levels Above 60 ML/Min/1.73 M². *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 2010, 56, 486–495, doi:10.1053/j.ajkd.2010.03.026.
17. Chawla, A.; Bhasin, G.; Chawla, R. Validation Of Neuropathy Symptoms Score (NSS) And Neuropathy Disability Score (NDS) In The Clinical Diagnosis Of Peripheral Neuropathy In Middle Aged People With Diabetes. 5.
18. Perkins, B.A.; Grewal, J.; Ng, E.; Ngo, M.; Bril, V. Validation of a Novel Point-of-Care Nerve Conduction Device for the Detection of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy. *Diabetes Care* 2006, 29, 2023–2027, doi:10.2337/dc08-0500.
19. Tesfaye, S.; Boulton, A.J.M.; Dyck, P.J.; Freeman, R.; Horowitz, M.; Kempler, P.; Lauria, G.; Malik, R.A.; Spallone, V.; Vinik, A.; et al. Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. *Diabetes Care* 2010, 33, 2285–2293, doi:10.2337/dc10-1303.
20. Bracic, M.; Stefanovska, A. Wavelet-Based Analysis of Human Blood-Flow Dynamics. *Flow Dyn.* 17.
21. Iatsenko, D.; McClintock, P.V.E.; Stefanovska, A. Linear and Synchrosqueezed Time–Frequency Representations Revisited: Overview, Standards of Use, Resolution, Reconstruction, Concentration, and Algorithms. *Digit. Signal Process.* 2015, 42, 1–26, doi:10.1016/j.dsp.2015.03.004.
22. Kvernmo, H.D.; Stefanovska, A.; Kirkebøen, K.A.; Kvernebo, K. Oscillations in the Human Cutaneous Blood Perfusion Signal Modified by Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Vasodilators. *Microvasc. Res.* 1999, 57, 298–309.
23. Reynès, C.; Vinet, A.; Maltinti, O.; Knapp, Y. Minimizing the Duration of Laser Doppler Flowmetry Recordings While Maintaining Wavelet Analysis Quality: A Methodological Study. *Microvasc. Res.* 2020, 131, 104034, doi:10.1016/j.mvr.2020.104034.
24. Bandrivskyy, A.; Bernjak, A.; McClintock, P.; Stefanovska, A. Wavelet Phase Coherence Analysis: Application to Skin Temperature and Blood Flow. *Cardiovasc. Eng.* 2004, 4, 89–93, doi:10.1023/B:CARE.0000025126.63253.43.
25. Okazaki, K.; Fu, Q.; Martini, E.R.; Shook, R.; Conner, C.; Zhang, R.; Crandall, C.G.; Levine, B.D. Vasoconstriction during Venous Congestion: Effects of Venoarteriolar Response, Myogenic Reflexes, and Hemodynamics of Changing Perfusion Pressure. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005, 289, R1354–R1359, doi:10.1152/ajpregu.00804.2004.
26. Snyder, K. a. M.; Shamimi-Noori, S.; Wilson, T.E.; Monahan, K.D. Age- and Limb-Related Differences in the Vasoconstrictor Response to Limb Dependency Are Not Mediated by a Sympathetic Mechanism in Humans. *Acta Physiol.* 2012, 205, 372–380, doi:10.1111/j.1748-1716.2012.02416.x.
27. Bagavathiappan, S.; Philip, J.; Jayakumar, T.; Raj, B.; Rao, P.N.S.; Varalakshmi, M.; Mohan, V. Correlation between Plantar Foot Temperature and Diabetic Neuropathy: A Case Study by Using an Infrared Thermal Imaging Technique. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2010, 4, 1386–1392, doi:10.1177/193229681000400613.
28. Davison, J.L.; Short, D.S.; Wilson, T.E. Effect of Local Heating and Vasodilation on the Cutaneous Venoarteriolar Response. 6.
29. Martini, R.; Bagno, A. The Wavelet Analysis for the Assessment of Microvascular Function with the Laser Doppler Fluxmetry over the Last 20 Years. Looking for Hidden Informations. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2018, 1–17, doi:10.3233/CH-189903.
30. Albers, J.W.; Pop-Busui, R. Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Emerging Treatments, and Subtypes. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2014, 14, 473, doi:10.1007/s11910-014-0473-5.

4. Étude 4:

Analgesic effect of time varying magnetic field device therapy on painful diabetic neuropathy: preliminary results of a double blind randomized controlled study

Effet antalgique d'un appareil de champ magnétique variable sur la neuropathie diabétique douloureuse : résultats préliminaires d'une étude randomisée en double aveugle contrôlée par placebo

Etude confidentielle en cours

Résumé de l'étude 4

La NP, première complication du diabète, est douloureuse dans 30 % des cas. Les traitements médicamenteux réduisent la douleur de 30 à 50 % et la moitié des patients traités se plaignent d'effets secondaires. Les thérapies alternatives sont régulièrement évoquées dans la prise en charge de la douleur et les PEMF en font partie. Les champs magnétiques ont démontré des effets sur la microcirculation qui pourraient expliquer leur effet antalgique.

L'objectif premier de cette étude était d'analyser les effets antalgiques aigus et chroniques sur 15 jours d'un traitement par champs magnétiques sur la NP douloureuse. L'objectif secondaire était d'étudier l'effet des champs magnétiques sur le flux sanguin cutané et la conduction nerveuse.

Actuellement, neuf participants ont été inclus mais seulement 7 ont terminé le protocole. Les patients ont fait deux visites à l'hôpital au début et à la fin du protocole. Lors de ces visites, les patients se sont vu affecter, de manière randomisée et en double aveugle, deux appareils « A » et « B » (placebo et actif) à chacun de leur pied. Des questionnaires, des tests de sensibilité et de conduction nerveuse ont aussi été réalisés. A ces évaluations, s'ajoutaient des enregistrements de microcirculation cutanée par LDF et LSCI sur le dos du pied, au repos et pendant l'application du PEMF ou du placebo. Les évaluations de la douleur étaient effectuées avant et après l'application du PEMF ou du placebo. Entre les deux visites, les patients utilisaient les appareils de PEMF pendant 15 jours matin et soir.

Les résultats en aigu sur les deux sessions n'ont pas démontré de différence entre les appareils sur la douleur mesurée par EVA, sur la diminution des seuils de douleur (mécanique et thermique) et sur l'augmentation de microcirculation cutanée. En chronique, quel que soit l'appareil, les symptômes de la NP et la douleur évalués par questionnaire ont été diminués. Aucun effet du traitement n'a été identifié sur les seuils de sensibilité et de douleur thermique, la conduction nerveuse et la microcirculation. Seul le seuil de douleur mécanique était diminué à la fin du traitement avec l'appareil actif.

Cette étude n'a pas démontré d'effet supérieur de l'appareil actif par rapport à son placebo. Cependant, les inclusions de patients sont encore en cours et une analyse plus approfondie des données pourrait mettre en évidence des différences entre les deux appareils.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Etude en cours

ANALGESIC EFFECT OF TIME VARYING MAGNETIC FIELD DEVICE THERAPY ON PAINFUL DIABETIC NEUROPATHY: A DOUBLE BLIND RANDOMIZED CONTROLLED PILOT STUDY.

Reynès C.¹, Latil-Plat F.², E. Benamo², Knapp Y.¹, Vinet A¹.

¹Avignon Université, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France

²Service endocrinologie et maladies métaboliques, Centre hospitalier Henri Duffaut, Avignon, France

Corresponding author : Avignon Université, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, F-84000, Avignon, France.

cecile.reynes@gmail.com

Keywords: Microcirculation, pulsed electromagnetic field, painful diabetic neuropathy

17 **1. Introduction**

18 Peripheral neuropathy is the most common complications of type 1 and type 2 diabetes (Boulton et
19 al., 2005). Approximately, 30% of patients suffer from pain (Davies et al., 2006) with symptoms
20 like burning feet, hyperalgesia and allodynia which worsen at night. This painful diabetic
21 neuropathy (PDN) severely impacts the quality of life of patients (Gore et al., 2005) and the benefits
22 of pharmacological treatments, purely symptomatic, are not sufficient in regard to their side effects.
23 Moreover, only a moderate efficacy of 30 to 50% reduction of pain has been reported (Pop-Busui
24 et al., 2017). It is therefore crucial for the clinicians to propose a complementary non-
25 pharmacological therapy.

26 During the past decade, pulsed electromagnetic field (PEMF) gained clinical interest because of its
27 analgesic potential on osteoarthritis or fibromyalgia (Negm et al., 2013; Shupak et al., 2006). The
28 use of PEMF to reduce pain in PDN is based on studies which reported positive impact of PEMF
29 with a significant reduction of pain (Musaev et al., 2003; Weintraub and Cole, 2004). However such
30 observations remain controversial since other studies demonstrated no effect (Wróbel et al., 2008).
31 Pain decrease could be explained by an improvement of nerve conduction (Graak et al., 2009)
32 and/or a diminution of pro-inflammatory markers as TNF- α and IL-6 and an increase of IL-10 (Mert
33 et al., 2015), suggesting an anti-inflammatory effect of PEMF noted in pre-clinical studies.
34 However, the precise mechanisms of action of PEMF remains unknown and the possibility of
35 whether PEMF have direct effect on pain or an indirect one needs to be explored.

36 Recently, PEMF has been shown to affect microcirculation (McKay et al., 2007) which is the major
37 cause of progressive nerve damages in neuropathy (Cameron et al., 2001). Two studies on PDN
38 have demonstrated an increase of capillary and cutaneous blood flow after only one session of
39 PEMF (Sun et al., 2016; Webb et al., 2003). The potential of PEMF to improve cutaneous
40 microcirculation is promising for PDN supposing that an improvement in skin blood flow may be

41 mirrored at the endoneural level. However, the lack of consensus on the analgesic effect of PEMF,
 42 as well as the absence of studies properly conducted on microcirculation in PDN patients highlight
 43 the need of further studies to assess the link between microcirculation and pain in the context of
 44 such pathologies.

45 Accordingly, the aim of this study was to investigate the acute and chronic effect of 15 days of
 46 PEMF therapy on pain, skin blood flow and nerve conduction in patients with PDN.

47

48 **2. Material and methods**

49 **2.1 Participants**

50 The PAIN trial is a clinical double blind randomized controlled study designed to examine the effect
 51 of a PEMF device on PDN. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration
 52 of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Ile de France VII-CHU de Bicêtre (approved
 53 the 16th of December 2019).

54

Table 1 : Clinical characteristics of the participants

55

	Participants
Women / Men	4 / 5
Diabetes type (DT1/DT2)	3 / 6
Age (years)	56.3 ± 10.2
BMI (kg/m ²)	30.0 ± 4.2
SBP (mmHg)	132.1 ± 14.0
DBP (mmHg)	76.0 ± 12.8
HR rest (bpm)	81.7 ± 17.1
Diabetes duration (years)	21.2 ± 16.9
Pain duration (years)	3.6 ± 4.3
Nb of patient with pain treatment	5

61

62 Nine participants (4 females, 5 males), aged 40-76 years, were included in the study after providing
 63 their informed written consent. Among them, 3 were type 1 diabetes and 6 were type 2 (Table 1).
 64 Enrolment criteria was the diagnostic of painful diabetic neuropathy for at least 6 months based on
 65 a score of DN4 ≥ 4 (Bouhassira et al., 2004). Patients were excluded if they have non-diabetic
 66 neuropathy or other causes of pain and amputations. For safety precautions with PEMF application,
 67 pregnancy, people with pacemaker or metal implants were also excluded. Patients maintained their
 68 quotidian medication (e.g. high blood pressure, dyslipidaemia, glycaemic control or pain
 69 treatments) throughout the study.

70 2.2 Protocol

71 All participants were instructed to present to their two assessments sessions at least two hours fasted
 72 and to abstain from caffeine. They were also instructed to avoid strenuous physical activity in the
 73 24 hours prior to their session. The first session took place on the first day of the study and the
 74 second session at the same hour on the last 15th day. Both sessions were performed in a quiet,
 75 temperature-controlled room (22-25°) with minimal external disturbances, while the participant
 76 remained in a comfortable sitting position. Prior to starting all assessments, two similar devices A
 77 and B were randomly assigned to right or left foot for the study duration. None of the participants
 78 and operator known which of the device was active or sham.

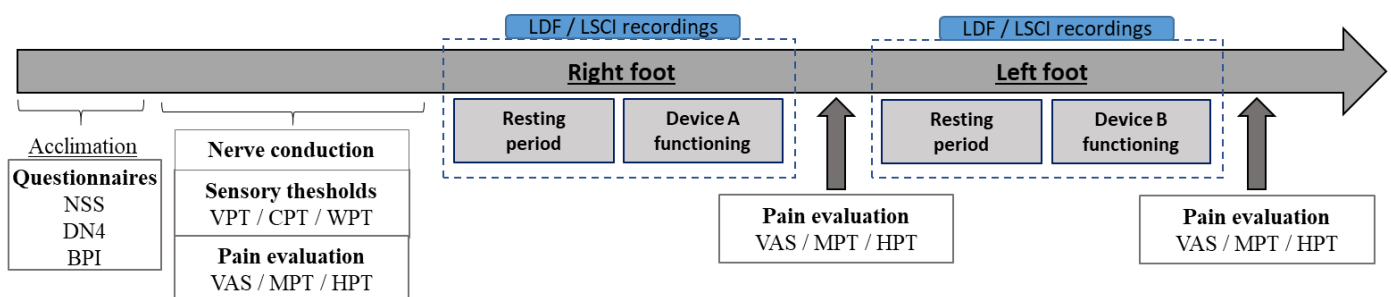


Figure 1 : Proceedings of the sessions on Day 1 and Day 15.

NSS, neuropathy Symptom Score ; DN4, Douleur neuropathique en 4 questions ; BPI, Brief pain inventory ; VPT, vibration perception threshold ; CPT, cold perception threshold ; WPT, warm perception threshold ; LDF, laser Doppler flowmetry ; LSCI, laser speckle contrast imaging ; VAS, visual analogue scale ; MPT, mechanical pain threshold ; HPT, heat pain threshold.

79 The proceedings of each session were described in Figure 1. Briefly, after blood pressure
80 measurement (OMRON 907, Omron Healthcare, Kyoto, Japan), the participants completed
81 questionnaires followed by sural nerve conduction testing and sensory thresholds evaluation. Pain
82 was measured with visual analogue scale (VAS) and mechanical and heat pain thresholds were
83 quantified before and immediately after device application (Figure 1).

84 After an acclimation period of 20 minutes, dorsal skin blood perfusion of each foot was recorded
85 6 minutes at baseline and continuously during 6 minutes all along each device was functioning.

86 ***2.3 Skin blood perfusion measurements***

87 Skin blood perfusion was assessed using laser speckle contrast imaging (PeriCam PSI System;
88 Perimed, Järfälla, Sweden) and laser Doppler flowmetry (Periflux 5000, Perimed, Sweden).

89 The laser Doppler flowmeter thermostatic probe (PF 481, Perimed, Stockholm, Sweden)
90 was placed on dorsal surface of the foot, between second and third metatarsal head, on intact skin.
91 Based on the Doppler principle, the probe emits and detects light partially backscattered in the tissue
92 by moving blood cells, causing a change in frequency. The proportion of non-shifted to shifted light
93 is related to the number of moving cells and the velocity of these cells, and is a characteristic of
94 tissue perfusion. The typical depth of the measurement is 1-1.5 mm, evaluating non-nutritive skin
95 blood perfusion. Laser Doppler flowmetry signals were recorded continuously at frequency of
96 32 Hz using an interfaced computer with data acquisition software (Perisoft, Perimed, Järfälla,
97 Sweden).

98 Laser speckle contrast imaging is based on the analysis of speckle pattern formed by random
99 interference in the backscattered light from the skin illuminated by an invisible infrared laser beam
100 is spread over the surface of the skin. Laser speckle contrast imaging allows for a penetration depth
101 of 0.05 mm, evaluating superficial nutritive skin blood perfusion (O'Doherty et al., 2009). All
102 measurements were performed with the laser head placed around 15 cm above the surface of the

103 skin (Mahé et al., 2011). A 4-cm² region of interest was defined above the LDF probe position.
104 Blood perfusion is obtained by analysing the variation in the speckle pattern. Skin blood perfusion
105 maps obtained using laser speckle contrast imaging were averaged to get a 2Hz acquisition
106 frequency (PimSoft 1.2.2.0; Perimed) and were expressed as conventional perfusion units (PU).

107 **2.4 Outcome measures**

108 The symptoms of diabetic neuropathy were evaluated by the *Neuropathy Symptom Score*
109 *questionnaire* (NSS) (Chawla et al., 2013). The presence of PDN was evaluated by the *DN4*
110 (Douleur neuropathique en 4 questions) consisting into four questions relating to the pain
111 description, association with abnormal sensations and brief bedside neurological examination in the
112 painful area (Bouhassira et al., 2004). Moreover, pain intensity and pain interference with daily
113 functions were assessed using the *Brief Pain Inventory* (BPI) (Zelman et al., 2005).

114 *Sural nerve conduction* was tested using the DPNCheck handheld device (Neurometrix, Waltham,
115 MA) which records the sural response to the electrical stimulation and reports velocity (SNCV, in
116 m/s) and sural nerve amplitude potential (SNAP, in μ V) (Pafili et al., 2017).

117 The *vibration* (VPT), *cold* (CPT) and *warm* (WPT) *perception thresholds* were defined using
118 NerveCheck (Phi Med Europe S.L., Barcelona, Spain). The VPT has void, mild (2.7 V), moderate
119 (4.2 V) and strong (6.4 V) with 9 stimuli in total. The CPT has void, mild (22.4°C), moderate
120 (17.8°C) and strong (9.8°C) with 5 stimuli in total. The WPT has void, mild (37°C), moderate
121 (39.4°C) and strong (44.7°C) with 5 stimuli in total (Ponirakis et al., 2016a).

122 All patients had an evaluation of the pain with *VAS*, where zero meant no pain and 10 was the worst
123 possible pain (McCormack et al., 1988). *Mechanical pain threshold* (MPT) was assessed on the
124 plantar surface of the foot with Von Frey Electronic device (BIO-EVF4, Bioseb, Vitrolles, France)
125 and was defined as the lowest pressure of punctate stimuli that produced a sensation of pain

126 (Chassaing et al., 2006). *Heat pain threshold* (HPT) was detected with NerveCheck by the increase
127 of temperature by 1°C/s from 32°C to 49°C on the dorsal foot skin (Ponirakis et al., 2016b).

128 All these tests were performed at the beginning of the two sessions and on both feet (except for
129 questionnaires NSS, DN4 and BPI). In addition, pain evaluations were also repeated after
130 application of the devices (Figure 1).

131 **2.5 Magnetic field treatment procedure**

132 All participant had two devices (A and B) randomly affected to a precise foot for the total duration
133 of the study. Randomisation has been made on My2lbox ([http://my2lbox.com/fr/generateur-](http://my2lbox.com/fr/generateur-groupe-aleatoires)
134 [groupe-aleatoires](http://my2lbox.com/fr/generateur-groupe-aleatoires)). Participants were instructed to install their two devices on the floor and placed
135 their feet above during 6 minutes, twice daily, one session in the morning and another before sleep
136 for 15 days.

137 The active device produces a sine-wave magnetic field of 200 mT at varying frequency between
138 4 and 10Hz coupled with a PEMF of 4mT at 20Hz. The sham device did not deliver any magnetic
139 field.

140 To assess the adherence of treatment and notice all adverse effects, participants had to write daily
141 their level of pain evaluated with VAS before and after each session and add commentaries about
142 the possible unpleasant sensations during the session.

143 **2.6 Data and statistical analysis**

144 For both periods of 6 minutes at rest and during device functioning, skin blood perfusion assessed
145 with laser Doppler flowmetry and laser speckle contrast imaging was averaged. From laser Doppler
146 flowmetry, velocity, concentration of moving blood cells (CMBC) and skin temperature have also
147 been averaged on the two periods of recordings. All these data were expressed in absolute value
148 and as a percentage of resting value when it was needed.

149 The required number of participants was a priori calculated using G*power 3.1. Alpha error
150 probability threshold was 0.05 and power of 0.95. The calculations were performed based on VAS
151 difference before and after FREMS therapy of the study of Bosi *et al*, (Bosi et al., 2005). Resulting
152 required sample size was 6 subjects. However, to take into account the non-adherence of treatment
153 and the sham treatment on one foot of each patient, a number of 12 subjects appeared feasible and
154 sufficient to evidence a reliable result.

155 All results were analysed with the SPSS software package (SPSS, Chicago, IL). A p-value of
156 $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data are presented as means \pm SDs.

157 Acute effect of PEMF has been explored by three-factor repeated-measures analyses of variance to
158 analyse the effect of device (2 levels: active and sham), day (2 levels: Day 1 and Day 15), condition
159 (2 levels: device OFF and device ON), and their interaction on perfusion assessed with LDF and
160 LSCI, velocity, CMBC, skin temperature. To note, condition levels were PRE and POST (PEMF
161 session) for VAS pain, MPT and HPT variables.

162 Data were tested for sphericity using Mauchly's test. Post-hoc tests were performed to identify mean
163 differences among variables when the effect of device \times condition, device \times day or device \times day \times
164 stimulation was significant. Otherwise, only significant simple effects or interaction effects were
165 reported.

166 Two-factor repeated-measures analyses of variance were performed to analyse the chronic effects
167 of devices on sensory thresholds, nerve conduction and resting levels of pain and microcirculation
168 at day 1 and day 15.

169 Finally, paired Student T-tests were performed to compare questionnaire score at day 1 and day 15.

170

171 **3. Preliminary results**

172 *To note only 9/12 patients were included at this time and also 2 patients among the 9 included did*
173 *not perform the Day 15's evaluation due to COVID-19 crisis, the results presented in this paper*
174 *included only 7 subjects.*

175 **3.1 Acute effect**

176 No effect has been found on pain assessed with VAS. However, significant interaction of condition
177 x device was found on MPT ($p < 0.05$), post-hoc showed a decrease of MPT on day 1 and an increase
178 on day 15 for active device only (Figure 2A). HPT was significantly decreased after device
179 application without interaction with device (simple condition effect $p < 0.04$). Perfusion assessed
180 with LSCI and LDF showed significant increase when devices functioning (respectively $p < 0.0001$;
181 Figure 2B and $p < 0.01$; Figure 2C) without interaction with device. CMBC and skin temperature
182 showed significant increase during device functioning whereas velocity decreased ($p < 0.02$) without
183 interaction with device.

184

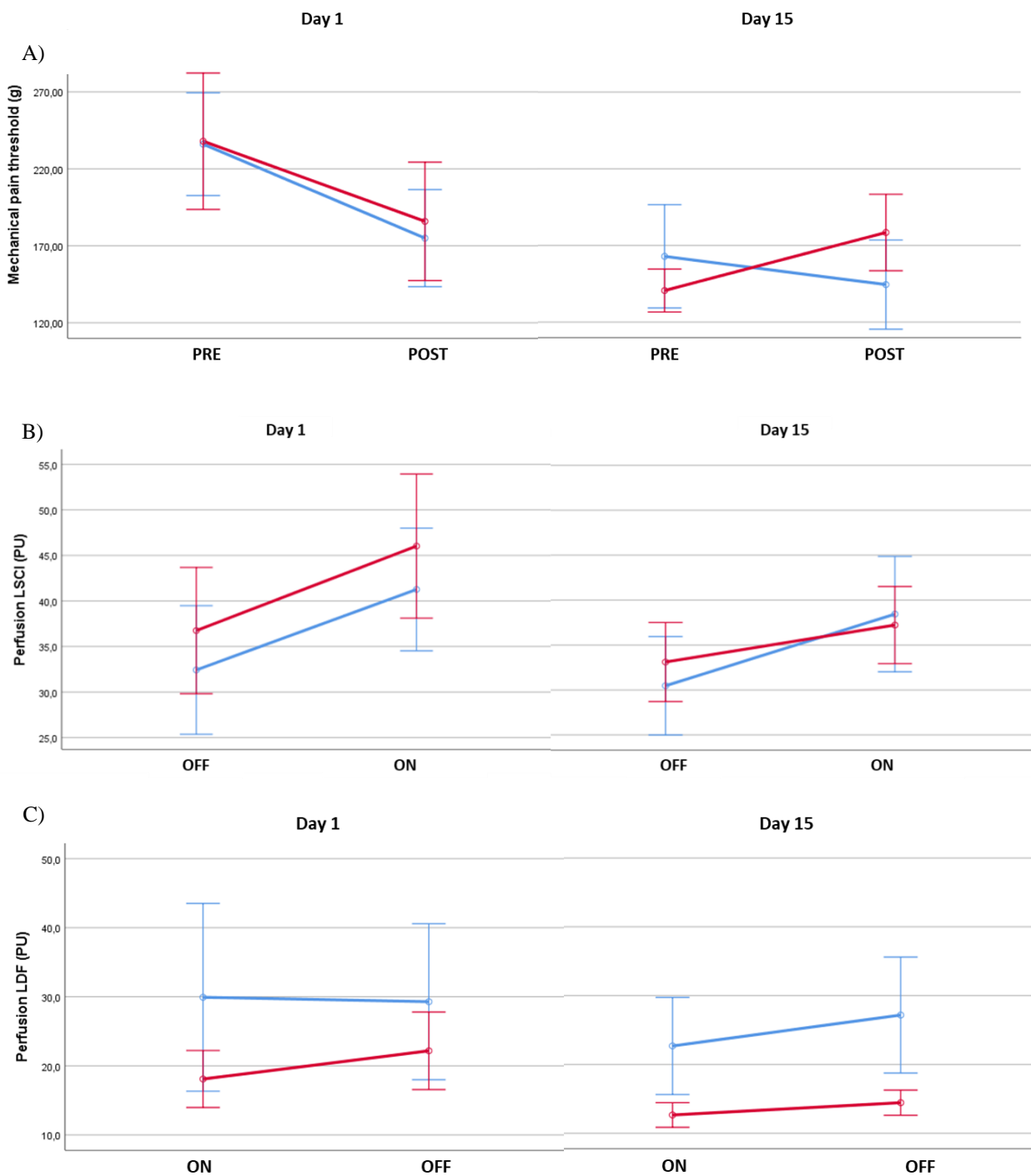


Figure 2 : Mechanical pain threshold (A), Perfusion assessed with LSCI (B) and LDF (C) at rest and post or during device application on day 1 and day 15 in each group (blue lines for sham; red lines for active device).

186 3.2 Chronic effect

187 Any adverse event was reported during the study and all participants showed a 100% adherence to
188 the treatment.

189 All questionnaire scores significantly decreased between day 1 and day 15 (Table 2).

190

Table 2: Questionnaire scores at Day 1 and Day 15.

	Day 1	Day 15
NSS Score	7.4 ± 2.18	5.9 ± 1.6*
DN4 Score	5.5 ± 1.2	4.4 ± 0.9***
BPI intensity	6.2 ± 1.9	4.3 ± 2.5*
BPI interference	6.2 ± 1.5	2.6 ± 2.0**

191 *NSS, neuropathy Symptom Score ; DN4, Douleur neuropathique en 4 questions ; BPI, Brief pain inventory. *p<0.05 ;*
192 ***p<0.01 ; ***p<0.001.*

193

194 There was no difference between days and device on sensory thresholds, nerve conduction,
195 microcirculation variables and pain assessed with VAS and HPT. Only, MPT was decreased on day
196 15 compared to day 1 without interaction with device (respectively for active 226.0 ± 105.9 ; 140.6
197 ± 37.0 and sham 210.7 ± 92.7 ; 162.9 ± 89.1 ; $p<0.05$).

198

199 4. Points for discussion

200 The present study did not show any effect of acute PEMF session and of 15 days treatment on
201 cutaneous microcirculation, nerve conduction, sensory thresholds and pain in PDN compared to
202 sham device. Only MPT decreased at the end of treatment and seems to be impacted differently by
203 PEMF application.

204 By definition, pain is a subjective experience. VAS has been widely used but it is based on self-
205 evaluation of pain and its perception could be affected by many environmental factors (McCormack

206 et al., 1988). In the present study, VAS did not change neither after one session of PEMF nor after
207 15 days of treatment. This result confirmed previous studies using such VAS scale with either a
208 same reduction of pain without difference between active and sham groups (Wróbel et al., 2008) or
209 no effect of treatment on VAS (Weintraub and Cole, 2004). In PDN, pain is present constantly and
210 often settled since a long time. In this way, the absence of improvement in VAS after 15 days of
211 treatment suggests the necessity of longer and/or more intense PEMF treatment.

212 According to the subjective effect of VAS, we have also tested HPT and MPT to quantitatively
213 assess pain thresholds. To our knowledge, this was the first study using quantitative devices to
214 analyse effect of PEMF on pain thresholds. HPT decreased after acute session of both devices in
215 each day. A possible familiarisation to the test could not be excluded as HPT did not change at the
216 end of treatment.

217 MPT demonstrated different response after acute and chronic treatment. After acute session, post-
218 hoc of condition x device interaction demonstrated an increase of MPT at day 15 with active PEMF
219 only. This suggested a reduction of sensitivity to mechanical pressure (i.e. the need of stronger
220 stimulus to induce pain sensation), in patients which are known to have hyperalgesia (Pop-Busui et
221 al., 2017). Some have suggested that PMF can depolarize, repolarize, and hyperpolarize neurons
222 and thus can modulate neuropathic pain (Wróbel et al., 2008), but whether this modulation is
223 efficient following one session is questionable... Nevertheless, MPT decreased at the end of
224 treatment whatever the device. Some explanations may be that patients anticipated their response
225 to pain. MPT decrease was not accompanied by changes in scores of sensory perception thresholds
226 of vibration, cold and warm. Further research is needed to evaluate whether PEMF treatment
227 influence MPT and the underlying mechanisms.

228 Microcirculation variables (i.e. perfusion, CMBC and velocity) did not changed at the end of
229 treatment. However, acute effect showed an increase of perfusion (assessed by LSCI and LDF) and

230 CMBC, and a decrease of velocity in each day session but paradoxically without difference between
231 active PEMF or sham device. Further analyses of devices characteristics demonstrated that light
232 vibrations are generated when the devices are functioning. LDF and LSCI are highly sensitive to
233 movement (Roustit and Cracowski, 2013) and these vibrations add noise and artefacts to the
234 perfusion signal recording. In this way, another processing of the data is ongoing for LSCI, with
235 definition of a reference ROI placed on the device only and the other ROI already analysed on foot
236 dorsum of the subject. We will aim to calculate the vibration noise and subtract it to the
237 microcirculatory signal of dorsal part of the foot to better understand the results.

238 An interesting result was the increase of skin temperature (assessed with LDF probe) with both
239 devices after each session (Day 1 and 15) which could be the cause of perfusion increase. However,
240 it is a minor increase (0.12°C to 0.17°C) and adding temperature as covariate in statistical analyse
241 did not change the results in microcirculation. Nevertheless, complementary data with probe
242 temperature fixed to 32°C need to be obtained to rule out the impact of skin temperature change on
243 skin blood flow increase.

244 Nerve conduction did not change at the end of the study which confirmed previous results
245 (Weintraub and Cole, 2004; Weintraub et al., 2009). In contrast, other studies reported an
246 improvement of conduction, more significant with a PEMF at frequency of 10 Hz than with a
247 frequency of 100 Hz (Musaev et al., 2003), due to increase of velocity and decrease of latency
248 (Graak et al., 2009). However, these results were questionable due to the lack of control group and
249 due to statistical weakness, respectively.

250 Finally, neuropathy questionnaires (i.e. NSS, DN4) and BPI score showed a great decrease at the
251 end of treatment whatever the device that highlighted the beneficial impact of global patient care.

252 There are several limitations to the present study. Firstly, the chosen questionnaires could hardly
253 discriminate pain and symptoms in each foot and so the device associated. However, we are not

254 aware of validated questionnaire focused on local pain. Secondly, as DPN is often symmetric, a
255 crossover study with washout period could have been better to isolate effect of PEMF device
256 compared to sham but COVID-19 crisis and time constraints have impacted our study. Finally, the
257 study duration of only 15 days could also explain our lack of results as the number and duration of
258 session by day (i.e. 6 minutes twice daily).

259

260 To conclude, the present study showed no superior effect of PEMF device compared to sham on
261 pain or cutaneous microcirculation and no effect on nerve conduction. More studies are needed to
262 clearly demonstrate a beneficial effect of PEMF on microcirculation and nerve conduction as found
263 in few studies. At the present time, PEMF is an area of research that would benefit from increased
264 investigation even if the potential effect to modify microcirculatory perfusion is far from proven.

265

266 *Perspectives*

267 It has also been showed that PEMF therapy positively impact diabetic foot ulcers with a decrease
268 of the wound healing time and an improvement of skin blood flow around the wound area (Kwan
269 et al., 2015). All those studies are promising in context of diabetes. Accordingly, further research
270 is needed to explore the effect of PEMF on pain and microvascular function in PDN patients.
271 Finally, the understanding of the mechanisms involved during PEMF session could be easily
272 applied on LDF signal with flowmotion as already tried in some studies (Nikolaeva et al., 2010;
273 Yan et al., 2011).

274

275 **Acknowledgments**

276 We thank the Hospital Staff of Avignon who offered the possibility to recruit patients, as well as
277 all of the participants. This work was supported by the Platform 3A, funded by the European
278 Regional Development Fund, the French Ministry of Research, Higher Education and Innovation,
279 the region Provence-Alpes-Côte d'Azur, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban
280 Community of Avignon.

281 **Author contributions**

282 **C. Reynès:** Patient recruitment, data acquisition, formal analysis, Writing - original draft, Writing
283 – review & editing. **F. Latil-Plat:** Patients recruitment. **E. Benamo:** Conceptualization, Patients
284 recruitment. **A. Vinet:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing -
285 review & editing. **Y. Knapp:** Conceptualization, Funding acquisition, Formal analysis, Writing -
286 review & editing. arthr

References

- Bosi, E., Conti, M., Vermigli, C., Cazzetta, G., Peretti, E., Cordoni, M.C., Galimberti, G., and Scionti, L. (2005). Effectiveness of frequency-modulated electromagnetic neural stimulation in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Diabetologia* 48, 817–823.
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J., et al. (2004). Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory: *Pain* 108, 248–257.
- Boulton, A.J.M., Vinik, A.I., Arezzo, J.C., Bril, V., Feldman, E.L., Freeman, R., Malik, R.A., Maser, R.E., Sosenko, J.M., and Ziegler, D. (2005). Diabetic Neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28, 956–962.
- Cameron, N.E., Eaton, S.E.M., Cotter, M.A., and Tesfaye, S. (2001). Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44, 1973–1988.
- Chassaing, C., Schmidt, J., Eschalier, A., Cardot, J.M., and Dubray, C. (2006). Hyperalgesia induced by cutaneous freeze injury for testing analgesics in healthy volunteers: Hyperalgesia induced by cutaneous freeze injury for testing analgesics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61, 389–397.
- Chawla, A., Bhasin, G., and Chawla, R. Validation Of Neuropathy Symptoms Score (NSS) And Neuropathy Disability Score (NDS) In The Clinical Diagnosis Of Peripheral Neuropathy In Middle Aged People With Diabetes. 5.
- Davies, M., Brophy, S., Williams, R., and Taylor, A. (2006). The Prevalence, Severity, and Impact of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29, 1518–1522.
- Gore, M., Brandenburg, N.A., Dukes, E., Hoffman, D.L., Tai, K.-S., and Stacey, B. (2005). Pain Severity in Diabetic Peripheral Neuropathy is Associated with Patient Functioning, Symptom Levels of Anxiety and Depression, and Sleep. *J. Pain Symptom Manage.* 30, 374–385.
- Graak, V., Chaudhary, S., Bal, B.S., and Sandhu, J.S. (2009). Evaluation of the efficacy of pulsed electromagnetic field in the management of patients with diabetic polyneuropathy. *Int. J. Diabetes Dev. Ctries.* 29, 56–61.
- Kwan, R.L.-C., Wong, W.-C., Yip, S.-L., Chan, K.-L., Zheng, Y.-P., and Cheing, G.L.-Y. (2015). Pulsed Electromagnetic Field Therapy Promotes Healing and Microcirculation of Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Pilot Study. *Adv. Skin Wound Care* 28, 212–219.
- Mahé, G., Haj-Yassin, F., Rousseau, P., Humeau, A., Durand, S., Leftheriotis, G., and Abraham, P. (2011). Distance between laser head and skin does not influence skin blood flow values recorded by laser speckle imaging. *Microvasc. Res.* 82, 439–442.
- McCormack, H.M., Horne, D.J. de L., and Sheather, S. (1988). Clinical applications of visual analogue scales: a critical review. *Psychol. Med.* 18, 1007–1019.

McKay, J.C., Prato, F.S., and Thomas, A.W. (2007). A literature review: The effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetics* 28, 81–98.

Mert, T., Gisi, G., Celik, A., Baran, F., Uremis, M.M., and Gunay, I. (2015). Frequency-dependent effects of sequenced pulsed magnetic field on experimental diabetic neuropathy. *Int. J. Radiat. Biol.* 91, 833–842.

Musaev, A.V., Guseinova, S.G., and Imamverdieva, S.S. (2003). The use of pulsed electromagnetic fields with complex modulation in the treatment of patients with diabetic polyneuropathy. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33, 745–752.

Negm, A., Lorbergs, A., and MacIntyre, N.J. (2013). Efficacy of low frequency pulsed subsensory threshold electrical stimulation vs placebo on pain and physical function in people with knee osteoarthritis: systematic review with meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 21, 1281–1289.

Nikolaeva, N.V., Bolotova, N.V., Luk'yanov, V.F., Raigorodskii, Y.M., and Tkacheva, E.N. (2010). Non-pharmacological correction of impaired microcirculation in children with diabetic polyneuropathy. *Neurosci. Behav. Physiol.* 40, 347–350.

O'Doherty, J., McNamara, P., Clancy, N.T., Enfield, J.G., and Leahy, M.J. (2009). Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J. Biomed. Opt.* 14, 034025.

Pafili, K., Maltezos, E., and Papanas, N. (2017). NC-stat for the diagnosis of diabetic polyneuropathy. *Expert Rev. Med. Devices* 14, 251–254.

Ponirakis, G., Odriozola, M.N., Odriozola, S., Petropoulos, I.N., Azmi, S., Fadavi, H., Alam, U., Asghar, O., Marshall, A., Miro, A., et al. (2016a). NerveCheck: An inexpensive quantitative sensory testing device for patients with diabetic neuropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 113, 101–107.

Ponirakis, G., Odriozola, M.N., Odriozola, S., Petropoulos, I.N., Azmi, S., Ferdousi, M., Fadavi, H., Alam, U., Marshall, A., Jeziorska, M., et al. (2016b). NerveCheck for the Detection of Sensory Loss and Neuropathic Pain in Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 18, 800–805.

Pop-Busui, R., Boulton, A.J.M., Feldman, E.L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R.A., Sosenko, J.M., and Ziegler, D. (2017). Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 40, 136–154.

Roustit, M., and Cracowski, J.-L. (2013). Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 373–384.

Shupak, N.M., McKay, J.C., Nielson, W.R., Rollman, G.B., Prato, F.S., and Thomas, A.W. (2006). Exposure to a Specific Pulsed Low-Frequency Magnetic Field: A Double-Blind Placebo-Controlled Study of Effects on Pain Ratings in Rheumatoid Arthritis and Fibromyalgia Patients.

Sun, J., Kwan, R.L.-C., Zheng, Y., and Cheing, G.L.-Y. (2016). Effects of pulsed electromagnetic fields on peripheral blood circulation in people with diabetes: A randomized controlled trial: PEMF on Circulation in People With Diabetes. *Bioelectromagnetics* 37, 290–297.

Webb, C.Y., Lo, S.S., and Evans, J.H. (2003). Prevention of diabetic foot using low frequency magnetotherapy. 6, 7.

Weintraub, M.I., and Cole, S.P. (2004). Pulsed Magnetic Field Therapy in Refractory Neuropathic Pain Secondary to Peripheral Neuropathy: Electrodiagnostic Parameters—Pilot Study. *Neurorehabil. Neural Repair* 18, 42–46.

Weintraub, M.I., Herrmann, D.N., Smith, A.G., Backonja, M.M., and Cole, S.P. (2009). Pulsed Electromagnetic Fields to Reduce Diabetic Neuropathic Pain and Stimulate Neuronal Repair: A Randomized Controlled Trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 90, 1102–1109.

Wróbel, M.P., Szymborska-Kajaneck, A., Wystrychowski, G., Biniszkiwicz, T., Sieroń-Stołtny, K., Sieroń, A., Pierzchała, K., Grzeszczak, W., and Strojek, K. (2008). Impact of low frequency pulsed magnetic fields on pain intensity, quality of life and sleep disturbances in patients with painful diabetic polyneuropathy. *Diabetes Metab.* 34, 349–354.

Yan, Y., Shen, G., Xie, K., Tang, C., Wu, X., Xu, Q., Liu, J., Song, J., Jiang, X., and Luo, E. (2011). Wavelet analysis of acute effects of static magnetic field on resting skin blood flow at the nail wall in young men. *Microvasc. Res.* 82, 277–283.

Zelman, D.C., Gore, M., Dukes, E., Tai, K.-S., and Brandenburg, N. (2005). Validation of a modified version of the Brief Pain Inventory for painful diabetic peripheral neuropathy. *J. Vasc. Nurs.* 23, 97–104.

Discussion

Cette discussion va dans un premier temps s'intéresser au **flowmotion** et à la qualité de son analyse ; dans un second temps, nous évaluerons l'apport du flowmotion par rapport aux analyses de perfusions classiques dans le **contexte de la NP** et de l'**application de stress microcirculatoires**. Nous évaluerons si les altérations identifiées grâce au flowmotion sont les mêmes lors d'un stress vasodilatateur (exercice) et vasoconstricteur (déclivité). Pour finir, nous discuterons l'apport de **thérapies alternatives** ciblées sur la microcirculation.

Le flowmotion : une bonne analyse ?

L'analyse spectrale des signaux LDF est intéressante pour l'étude de la fonction microcirculatoire chez l'homme mais reste relativement peu utilisée : seuls 97 articles utilisant l'analyse en ondelettes entre 1990 et 2017 ont ainsi été répertoriés dans la revue de Martini et Bagno (Martini and Bagno, 2018). Ceci peut s'expliquer en partie par un manque de consensus et de recommandations, notamment sur la manière de traiter les données et sur le temps d'enregistrement optimal.

En effet, la seule indication disponible sur le temps d'enregistrement mettait en avant la nécessité d'un temps d'enregistrement le plus long possible pour limiter l'impact du cône d'influence sur les données (Iatsenko et al., 2015). De façon consensuelle, il était ainsi admis un temps d'enregistrement d'au moins 20 minutes (Martini and Bagno, 2018) mais aucune étude n'avait validé cette durée. Notre première étude a démontré, ***chez des sujets sains, que ce temps pouvait être diminué à 10 minutes pour une analyse de la composante myogénique, quel que soit le site de mesure (avant-bras ou dessus du pied). Sur l'avant-bras, les bandes neurogénique et endothéliale nécessitent une durée de 15 et 10 minutes respectivement, et sur le pied 13 minutes pour ces deux bandes.*** La réduction de ce temps d'analyse revêt une importance clinique pour non seulement, un gain de temps mais aussi la possibilité d'aller investiguer le flowmotion chez des sujets où la position immobile est problématique (enfants, sujets avec des douleurs...). Ceci était ainsi primordial pour notre étude NEUROMICRO qui enchaînait plusieurs stimuli chez une population de patients DT2 avec NP, lesquels ont des sensations de fourmillements, de brûlures et parfois des douleurs dans les jambes limitant leur capacité à rester immobile. Cependant, la validité de nos recommandations dans une population pathologique reste à confirmer.

En cohérence avec ces recommandations, pour l'étude NEUROMICRO, les différents enregistrements (repos, VAR, récupération TM6, LTH) ont été mis bout à bout pour avoir un temps d'analyse le plus long possible (45 minutes). Ainsi, le VAR et le TM6, d'une durée de 6 et 10 minutes respectivement, ont pu être analysés en limitant les effets de bord.

Certains auteurs extraient des périodes beaucoup plus courtes, comme par exemple sur le pic axonal de LTH de 30 secondes (Hodges et al., 2017b). La question se pose quant à la validité des données obtenues sur une période aussi courte, au vu notamment de la périodicité de la bande de fréquence la plus basse, 105 secondes pour l'endothéliale. De plus, bien que ces phénomènes soient encore à l'étude, il est établi que les bandes interagissent, s'influencent et se synchronisent au travers d'une forme de « cross-talk » inter-bandes (Clough et al., 2017). Il convient donc dorénavant de définir des durées minimales d'extraction pour que les analyses et les résultats soient valides et comparables entre les études.

Il manque aussi des recommandations sur le post-traitement des données. Suite aux travaux de Stefanovska et al. (1999), l'analyse spectrale en ondelettes des signaux LDF fait consensus (Stefanovska et al., 1999). Par contre, des divergences existent sur l'expression en valeur moyenne ou médiane dans les bandes de fréquence, et en valeurs absolues ou relatives (normalisées sur le spectre total). Dès lors que le spectre total est différent entre les sujets et/ou modifié par un quelconque stimulus, il semble évident de non seulement discuter les valeurs absolues mais aussi de les exprimer en valeurs relatives pour pouvoir comparer les contributions de chaque bande. Le choix de présenter les données en valeur moyenne ou en valeur médiane ne semblait pas impacter nos résultats. Enfin, le calcul de la contribution de chaque bande sur le spectre total varie selon les études : pour nos études, l'amplitude moyenne ou médiane de chaque bande était rapportée à la somme des bandes du spectre total ; d'autres auteurs rapportent l'amplitude moyenne de chaque bande sur l'amplitude moyenne du spectre total (Kvernmo et al., 1998; Liao and Jan, 2017). Ceci impacte les résultats et de fait rend difficile les comparaisons entre études. Ce point est bien illustré par l'équipe de Jan. En 2013, ils ont traité leurs données de LTH chez des DT2 et des contrôles avec le calcul suivant :

$$\frac{\text{Moyenne de chaque bande sur le LTH (pic ou plateau)}}{\text{Moyenne de chaque bande au repos}}$$

Ils ont ainsi montré une diminution des bandes endothéliale, neurogénique et myogénique sur la période pic et sur la période plateau chez les DT2 par rapport aux sujets contrôles (Jan et al., 2013). En 2017, avec les mêmes signaux, ils ont utilisé le calcul suivant :

$$\frac{\text{Valeur absolue moyenne de chaque composante dans le temps et dans l'intervalle de fréquence sur le LTH (pic ou plateau)}}{\text{Valeur absolue moyenne du spectre total dans le temps et dans l'intervalle de fréquence (0.0095-2 Hz)}}$$

Ils ont alors démontré une diminution de la seule bande neurogénique sur la période pic et de la bande endothéliale sur la période plateau chez les DT2 vs contrôles (Liao and Jan, 2017).

Dans ce sens, l'analyse de nos signaux, en utilisant le ratio de chaque bande pendant le stimulus par rapport à sa valeur au repos, pourrait venir compléter notre compréhension des mécanismes impliqués chez nos sujets DT2 avec et sans NP.

Dans nos études, l'analyse flowmotion a été seulement réalisée sur les signaux LDF mais il aurait aussi été possible de les réaliser avec le LSCI. Mizeva et al (2019) ont rapporté une forte corrélation entre les différentes bandes de fréquences analysées en ondelettes sur des signaux LDF et LSCI. Ils en ont conclu que les mécanismes sous-jacents étaient similaires, quel que soit l'outil utilisé (Mizeva et al., 2019).

En résumé, le flowmotion est une méthode d'analyse des mécanismes de la fonction microcirculatoire non-invasive très intéressante. Son utilisation en routine clinique reste encore problématique au regard du post-traitement du signal à réaliser. Développer un logiciel d'analyse en ondelettes (PeriSoft fait l'analyse en transformées de Fourier) des signaux LDF et/ou LSCI, qui génère automatiquement les valeurs de chaque bande et du spectre total sur des périodes définies, serait un moyen de rendre le flowmotion plus accessible aux cliniciens.

Au-delà de l'analyse flowmotion, d'autres techniques permettent d'étudier les caractéristiques non-linéaires et la complexité du flux sanguin cutané qui sont des indicateurs d'un changement pathologique (Liao et al., 2018). L'entropie sur des signaux LDF a démontré des résultats prometteurs sur le pied diabétique (Liao et al., 2018) et il a été mis en évidence que l'entropie de signaux LSCI suit le même pattern que sur des signaux LDF (Humeau-Heurtier et al., 2012). Ces méthodes de traitement du signal ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de la régulation du flux sanguin cutané et de ses mécanismes.

Altérations des réponses microcirculatoires aux différents stimuli

Dans nos études, les DT2 avec NP ne présentaient pas de différence de niveaux de perfusion au repos. Induire un stress permet de mettre potentiellement en évidence une dysfonction non présente ou masquée au repos.

Dans ce sens, nous avons utilisé 3 tests différents. Ces tests ont été choisis sur leur caractère local ou sous-maximal et sur leur faisabilité en routine clinique :

- le pied en déclivité

Pour ce test, en position allongée, il suffit de venir placer la demi jambe sur le côté du lit. Il déclenche ainsi le réflexe veino-artériolaire mais met en jeu une colonne de sang réduite par rapport à la mise en position debout (Belcaro and Nicolaidis, 1991).

Nous avons choisi ce test pour ne déclencher qu'une réaction des mécanismes locaux sans activation des barorécepteurs. En effet, nous n'avons pas noté de modification ni de la fréquence cardiaque, ni de la pression artérielle. De cette manière, la présence de NAC parmi nos patients n'impactait pas la réponse au VAR et leur exclusion au sein des différents groupes ne modifiait pas nos résultats.

- ***L'exercice : TM6***

Pour réaliser cet exercice (de routine), seul un couloir de 25 m est nécessaire. Il est plus facile à mettre en place que des tests maximaux sur vélo dans une population diabétique et en surpoids/obèse. Sous-maximal (60 % de la FC_{MAX} théorique atteinte), il provoque quand même un stress hémodynamique et une augmentation des perfusions et ce, jusque pendant la récupération. L'enregistrement pendant la marche n'était pas possible. Il a donc été réalisé post-exercice en récupération allongée passive au plus près de la fin du TM6. De fait, les signaux enregistrés combinent les effets de l'exercice et du changement de position (debout-allongé).

- ***L'hyperhémie thermique locale***

Ce stimulus local, dont les mécanismes sont bien connus (Minson et al., 2001), a été utilisé, dans le cadre des travaux présentés, pour provoquer une vasodilatation maximale. Il nous a permis d'indexer la vasodilatation engendrée par l'exercice par rapport à cette vasodilatation maximale (vasodilatation pendant la récupération exercice = 40 % du plateau LTH). Les résultats spécifiques du LTH seront utilisés pour identifier à priori les sujets présentant une NP, ceci sera développé dans les perspectives.

Le choix d'utiliser le LDF et le LSCI au repos et pendant la récupération du TM6 repose sur l'idée originale d'observer les changements de perfusion dans deux lits vasculaires différents : au niveau des boucles capillaires (LSCI) et au niveau des AVAs (LDF). Comme l'exercice engendre des changements de température, l'étude de ces deux lits vasculaires impliqués dans la thermorégulation est intéressante. Quelques points méthodologiques méritent d'être discutés : 1) le positionnement des sondes LDF au niveau du pied a été privilégié par rapport à l'avant-bras en cohérence avec notre population de NP. Les 2 sondes ont été placées sur de la peau non glabre mais il aurait été intéressant d'en positionner une au niveau de la voûte plantaire (peau glabre). Cependant, la pression sur cette zone lors de la marche l'aurait fortement stimulée, 2) la température des sondes LDF n'a pas été fixée, afin de prendre en compte les différences existantes liées au diabète et à la présence de NP (Bagavathiappan et al., 2010), 3) la non-indexation systématique des données de perfusion en CVC.

Ce dernier point s'explique par le fait que, au cours du VAR, aucune modification de pression artérielle n'a été notée, les résultats exprimés en PU et en CVC donnaient les mêmes résultats. Lors de la récupération post-TM6, les mesures de pression artérielle n'étaient pas continuellement suivies (pas de Finapres) rendant obsolète l'analyse en cinétique des CVC.

Tous les tests utilisés ont mis en avant une diminution des réponses vasodilatatrices (post-TM6 et LTH) et vasoconstrictrices (déclivité) chez les DT2 avec NP confirmée. Une diminution de la réponse pour les DT2 avec NP infraclinique n'a été notée qu'en récupération post-TM6. Dans nos analyses, nous avons prédéfini nos groupes selon la classification du consensus de Toronto afin de graduer le niveau de NP (Tesfaye et al., 2010). Nous nous sommes toujours questionnés sur la définition « parfaite » de la NP : chaque patient présente une NP propre avec l'atteinte d'un ou plusieurs types de fibres, avec la présence de symptômes ou non et la présence de douleurs ou non. En essayant de caractériser au mieux cette NP et avec la précision de nos tests quantitatifs, nous avons observé la présence de NP chez certains de nos sujets obèses (n=8/22). Notre groupe obèse est comparable aux groupes diabétiques en terme de moyenne sur l'IMC mais n'est pas comparable sur la distribution. Ce groupe, considéré comme « contrôle » pour isoler l'effet diabète, devrait plutôt être considéré comme un autre groupe pathologique avec l'effet isolé de l'obésité sur la réponse microvasculaire et l'effet potentiel pré-diabétique (Jonk et al., 2007). En effet, 11 à 25 % des sujets pré-diabétiques ou avec un syndrome métabolique présentent une NP (Papanas et al., 2011; Ziegler et al., 2008). Malheureusement, nous n'avons pas le HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insuline resistance) pour objectiver ce pré-diabète et l'insulino-résistance mais leur glycémie à jeun ($1,0 \pm 0,1$ g/l) ou leur HbA1c ($5,4 \pm 0,3$ %) étaient comprises dans des valeurs normales. Finalement, il a aussi été démontré que l'obésité seule était suffisante pour induire une NP (Callaghan et al., 2020). Réaliser une comparaison sur les résultats des seuls groupes contrôles normo-pondérés et obèses, avec et sans NP, serait de fait intéressant.

Le nombre et/ou le type d'autres complications diabétiques peuvent-ils avoir un impact sur les réponses de perfusion et/ou de flowmotion ?

La présence de rétinopathie, néphropathie et de NAC a été recherchée chez tous les patients DT2. L'analyse statistique par un khi-deux n'a pas révélé de différence significative du nombre et du type de ces complications entre les groupes de diabétiques. Seul un nombre plus important de sujets nous aurait permis de créer nos groupes de sévérité de NP et de faire des sous-groupes en fonction du nombre et/ou du type de complications microangiopathiques associées. La temporalité de développement (ou de diagnostic) des différentes complications est encore sujet à débat.

Il y a des liens entre l'apparition de certaines complications ; par exemple, au stade précoce de NAC, la NP n'est présente que chez 20 % des patients puis sa prévalence augmente avec la sévérité de la NAC (Bilal et al., 2008). L'explication d'un développement conjoint de plusieurs complications reste encore à explorer.

Apport supplémentaire du flowmotion par rapport à l'analyse de perfusion

L'originalité de nos travaux repose sur l'analyse flowmotion au cours de différents stimuli dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution de la réponse microvasculaire chez les patients DT2 avec NP. Les deux tests utilisés, VAR comme TM6, ont provoqué des changements de flowmotion démontrés par une augmentation du spectre total plus importante en récupération post-exercice que lors du pied en déclivité. Lors de la récupération post-exercice, ce spectre total augmentait moins chez les DT2 avec NP confirmée par rapport aux autres expliquant leur moindre niveau de perfusion.

L'analyse conjointe des résultats aux deux tests, bande par bande, permet de dresser le tableau suivant :

- L'altération de la fonction endothéliale est retrouvée seulement en récupération post-exercice où l'augmentation de cette bande est moindre chez les DT2 avec NP confirmée. L'évolution de la composante endothéliale lors du VAR n'était pas différente entre les groupes. Une possible hypothèse est la moindre contribution de la fonction endothéliale au contrôle du VAR (< 20 % du spectre total) par rapport au post-exercice (\approx 60 % du spectre total). Cette faible participation de la bande endothéliale au cours du VAR ne permettrait pas de dévoiler des différences intergroupes, alors que la forte implication de cette bande à l'exercice mettrait en évidence la dysfonction endothéliale présente chez les DT2 et encore plus en présence de NP (Roustit et al., 2016). Ainsi pour la première fois, nous confirmons cette dysfonction par l'analyse flowmotion.
- Quel que soit le stimulus, la composante myogénique n'est pas discriminante entre nos groupes. Le contrôle par autorégulation réagit immédiatement à un changement de pression pour protéger les capillaires (Okazaki et al., 2005). Dès lors que cette réaction des CML s'est produite, la part myogénique s'efface pour laisser les autres composantes réguler le flux sanguin. Ce phénomène pose encore la question de l'analyse flowmotion sur une durée « longue » pendant ou après un stimulus et des durées minimales d'extraction du flowmotion.

Pour la déclivité, au moment où le pied descend en dessous du niveau du cœur, le sang afflux immédiatement dans le pied puis se stabilise. Notre analyse pendant 6 minutes en position déclive comprend, une très courte période correspondant à la réponse myogénique immédiate, mais aussi une longue période où d'autres mécanismes s'activent pour maintenir la perfusion tissulaire. De même, après l'exercice, la relativement faible augmentation des perfusions (+25 % par rapport au repos) et la diminution de la bande myogénique pendant la récupération pourraient s'expliquer par l'analyse sur une récupération longue après un exercice sous-maximal. Ainsi, lors de ces deux protocoles, le contrôle myogénique semble moins impliqué dans les réponses microcirculatoires.

- Le résultat majeur concerne la composante neurogénique. Pendant la récupération post-TM6, sa contribution diminuait, comme la bande myogénique dans tous les groupes, pour permettre un retour au niveau de perfusion de repos mais cette diminution était moins importante chez les DT2 avec NP confirmée et les DT2 sans NP par rapport aux autres groupes. Ceci peut expliquer leur moindre augmentation de perfusion post-TM6 liée à une capacité de vasodilatation active thermorégulatrice réduite. Au contraire, pendant la déclivité, cette composante neurogénique ne démontrait pas d'évolution dans le groupe DT2 avec NP confirmée et augmentait dans le groupe de NP infraclinique alors qu'elle était diminuée dans les autres groupes (contrôle normo-pondéré, obèse et DT2 sans NP). Cette évolution différente, selon la sévérité de la NP, suggère une augmentation transitoire de l'activité neurogénique avec une suractivation sympathique pendant les premiers stades de NP, qui évoluerait ensuite vers des altérations marquées avec absence de réponse. En d'autres termes, cela pourrait refléter une adaptation compensatoire initiale. Cette détection d'altérations subtiles chez les DT2 avec NP infraclinique n'a pas été dévoilée par les seules données de perfusion. Cette réponse spécifique n'a pas non plus été retrouvée pendant la récupération post-TM6 et pourrait s'expliquer par le fait que l'exercice engage des mécanismes centraux (bandes cardiaque et respiratoire) qui contribuent au spectre total masquant des dysfonctions subtiles locales.

Ainsi, l'analyse du flowmotion apporte des informations complémentaires sur les mécanismes permettant de réguler le flux sanguin cutané lors des différents stimuli chez les DT2 avec ou sans NP.

Thérapies alternatives

L'ambition de notre dernière étude reposait sur le constat de l'effet des PEMF sur la microcirculation dans le contexte de la NP (Aj et al., 2017), de l'ulcère du pied diabétique (Kwan et al., 2019) et des effets bénéfiques sur la douleur (Mirkovic et al., 2012; Weintraub and Cole, 2004).

A l'heure actuelle, l'analyse de nos résultats ne montre pas d'effet supérieur des appareils actifs par rapport au placebo. Le recrutement de cette population a été compliqué et la pandémie de COVID-19 a freiné les inclusions. Il manque 5 patients pour atteindre notre objectif de 12 prévus initialement.

La douleur étant très subjective et la neuropathie symétrique, l'évaluation locale sur chaque pied est difficile à déterminer. Le protocole choisi visait à tester l'effet de l'appareil actif sous un pied et d'avoir le contrôle par placebo sous l'autre pied, avec une affectation randomisée en double aveugle. Un protocole en cross-over avec une période de wash-out aurait sans doute été préférable. En effet, une étude randomisée en double aveugle sur deux groupes traités en parallèle a démontré un effet bénéfique sur la douleur et une amélioration du seuil de sensibilité au froid d'un traitement par électrothérapie comparé au traitement placebo (Bosi et al., 2013). De même, la durée des séances (2 fois 6 minutes par jour) et du traitement (15 jours) semble trop courte pour mettre en avant des effets d'un PEMF sur la douleur et la microcirculation, même si nous pouvons nous réjouir que tous les patients inclus aient noté une diminution de leur douleur suite au traitement (actif mais aussi placebo).

Suite à la levée de l'aveugle, nous avons fait le constat que les perfusions cutanées augmentaient non seulement avec l'appareil PEMF mais aussi avec l'appareil placebo suggérant l'existence d'un artefact vibratoire. La vibration créerait des légers mouvements du pied et serait potentiellement responsable de l'augmentation de perfusion mesurée par LSCI avec les 2 appareils. En ce sens, de nouvelles analyses vont être lancées pour valider ou invalider cette hypothèse ce qui, le cas échéant, permettrait de limiter ces artefacts de vibration. Dans ce cas, pour les sujets restant à inclure, une modification du protocole sera envisagée.

Conclusion et perspectives

Conclusion

En conclusion, l'ensemble de ce travail de thèse a permis de définir un temps d'enregistrement minimum pour faire une analyse fiable du flowmotion et de le raccourcir par rapport aux recommandations existantes. Nous avons mis en avant des dysfonctions de réponses microcirculatoires chez les sujets DT2 avec NP confirmée et infraclinique lors de deux tests sous-maximaux et expliqué les mécanismes impliqués grâce au flowmotion. Il semblerait que la dysfonction endothéliale (bande endothéliale) et l'atteinte nerveuse (bande neurogénique) participent à cette mauvaise réponse microvasculaire. Enfin, l'étude PAIN encore en cours devrait nous apporter un regard neuf sur les thérapies alternatives dans la prise en charge de la neuropathie.

Perspectives

Une première perspective est de continuer à valoriser nos données obtenues lors des différents tests de réactivité microcirculatoire de l'étude NEUROMICRO. L'idée d'utiliser ces données comme outil de détection précoce de la neuropathie (Park et al., 2016) était séduisante mais reste problématique du fait du caractère transversal de notre étude. Par contre, une nouvelle expression des données de flowmotion telle que proposée par Jan et al. (Jan et al., 2013), i.e. valeur de la bande stimulée sur sa valeur de repos, nous permettra de combiner les résultats aux 3 tests (VAR, TM6 et LTH) afin d'encore mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux dysfonctions microcirculatoires chez les DT2.

Dans nos précédents travaux, nous nous sommes focalisés sur les relations entre fonction microcirculatoire et NP sans s'attacher à l'effet du type de fibres. A notre connaissance, peu d'études explorent ce point. Aussi, en collaboration avec M. Roustit (Grenoble), nous traitons actuellement nos données de LTH (test dont les mécanismes sont les mieux connus et définis) en relation avec nos différents outils d'exploration des différentes fibres. Après une première analyse, il semble que le pic axonal soit corrélé avec la vitesse de conduction nerveuse, indépendamment de l'IMC et de l'HbA1c. Ce résultat préliminaire suggère un fort lien indépendant du groupe (obèse ou diabétique). Au cours de la phase plateau, ce lien disparaît logiquement. Ces travaux doivent être approfondis et feront l'objet d'une "short communication" dans les mois à venir.

Une autre perspective concerne plus spécifiquement la NAC. Cette dernière a été détectée chez tous nos sujets DT2 et obèses par 3 tests d'Ewing (Ewing et al., 1985). Dans l'étude NEUROMICRO, la fréquence cardiaque a été enregistrée au repos, pendant le TM6 et pendant la récupération post-TM6. Aussi l'objectif de cette étude, en collaboration avec J-B. Beaume et M. Bowen (LIBM EA7424, Chambéry, France), est de comparer les cinétiques des données de variabilité de fréquence cardiaque (VFC) au cours de la phase de récupération post-TM6, chez des DT2 avec et sans NAC, par une méthode de traitement originale : le statistical parametric mapping (SPM). En effet, les méthodes d'analyse classique de VFC ne permettent pas d'accéder à l'analyse évolutive dynamique de la balance sympatho-vagale au cours du temps pendant la récupération tardive. Les résultats actuels par analyse SPM des cinétiques basses et hautes fréquences suggèrent un ajustement non seulement plus petit mais aussi plus lent chez les DT2 avec NAC par rapport aux DT2 sans NAC. L'article est en cours de rédaction et a fait l'objet d'un poster (annexe 3) et d'une communication orale.

L'analyse de la complexité des signaux LDF par l'entropie au cours des différents stimuli nous apparaît comme la prochaine étape de notre travail. Chez les DT2 avec NP, Liao et al. ont démontré une diminution de l'entropie chez les sujets NP (sans graduation de la sévérité) par rapport à des contrôles, que ce soit au repos ou sur les deux phases de LTH, et ont expliqué ces résultats par des valeurs diminuées sur les composantes du flowmotion (Liao and Jan, 2017; Liao et al., 2018). Cette analyse de la complexité des signaux via l'entropie (qui nécessitera une formation préalable) pourrait apporter des informations complémentaires sur les explications des mécanismes impliqués lors de stimuli vasodilatateur et vasoconstricteur dans des groupes contrôle, obèses, DT2 avec ou sans NP.

Avec une vision à plus long-terme, la prise en charge non-médicamenteuse de la NP nous intéresse. Les dernières inclusions de l'étude PAIN vont clôturer l'étude sur les champs magnétiques. En fonction des résultats et du nouveau traitement des données, nous pourrions envisager de mener une étude sur une plus grande cohorte en cross-over.

Finalement, l'activité physique adaptée étant ma formation première, une prise en charge de la NP par l'exercice chronique serait intéressante, d'autant que nous savons que l'activité physique améliore le contrôle glycémique, la sensibilité à l'insuline (Colberg et al., 2006; Snowling and Hopkins, 2006), la microcirculation (Cohen et al., 2008; Olver and Laughlin, 2016) et la conduction nerveuse (Balducci et al., 2006).

Bibliographie

~ A ~

Abbott, C.A., Malik, R.A., van Ross, E.R.E., Kulkarni, J., and Boulton, A.J.M. (2011). Prevalence and Characteristics of Painful Diabetic Neuropathy in a Large Community-Based Diabetic Population in the U.K. *Diabetes Care* 34, 2220–2224.

Abraham, P., Bourgeau, M., Camo, M., Humeau-Heurtier, A., Durand, S., Rousseau, P., and Mahe, G. (2013). Effect of skin temperature on skin endothelial function assessment. *Microvascular Research* 88, 56–60.

Agarwal, S.C., Allen, J., Murray, A., and Purcell, I.F. (2010). Comparative reproducibility of dermal microvascular blood flow changes in response to acetylcholine iontophoresis, hyperthermia and reactive hyperaemia. *Physiol. Meas.* 31, 1–11.

Aj, T., Jacoby, R.M., Muhlenfeld, J., and Aps, S. (2017). A Randomized, Sham-Controlled, Double-Blind Pilot Study of Pulsed Electromagnetic Field Therapy to Evaluate Small Fiber Nerve Growth and Function and Skin Perfusion in Subjects with Painful Peripheral Diabetic Neuropathy.

Alam, U., Sloan, G., and Tesfaye, S. (2020). Treating Pain in Diabetic Neuropathy: Current and Developmental Drugs. *Drugs*.

Albers, J.W., and Pop-Busui, R. (2014). Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Emerging Treatments, and Subtypes. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 14, 473.

American Diabetes Association. (2004). Gestational diabetes mellitus. *Diabetes care*, 27, S88.

American Diabetes Association (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 37, S81–S90.

American Thoracic Society. (2002). ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 111-117.

Arora, S., Smakowski, P., Frykberg, R.G., Simeone, L.R., Freeman, R., LoGerfo, F.W., and Veves, A. (1998). Differences in Foot and Forearm Skin Microcirculation in Diabetic Patients With and Without Neuropathy. *Diabetes Care* 21, 1339–1344.

Asad, A., Hameed, M.A., Khan, U.A., Ahmed, N., and Butt, M.-R.A. (2010). Reliability of the neurological scores for assessment of sensorimotor neuropathy in type 2 diabetics. *J Pak Med Assoc* 60, 5.

Aslam, A., Singh, J., and Rajbhandari, S. (2014). Pathogenesis of Painful Diabetic Neuropathy. *Pain Res. Treat.* 2014, 1–7.

Atkinson, C.L., Carter, H.H., Thijssen, D.H.J., Birk, G.K., Cable, N.T., Low, D.A., Kerstens, F., Meeuwis, I., Dawson, E.A., and Green, D.J. (2018). Localised cutaneous microvascular adaptation to exercise training in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 118, 837–845.

Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., and Michels, A.W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet* 383, 69–82.

~ B ~

Bagavathiappan, S., Philip, J., Jayakumar, T., Raj, B., Rao, P.N.S., Varalakshmi, M., and Mohan, V. (2010). Correlation between Plantar Foot Temperature and Diabetic Neuropathy: A Case Study by Using an Infrared Thermal Imaging Technique. *J. Diabetes Sci. Technol.* 4, 1386–1392.

Bagno, A., and Martini, R. (2015). Wavelet analysis of the Laser Doppler signal to assess skin perfusion. In 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), (Milan: IEEE), pp. 7374–7377.

Bagno, A., and Martini, R. (2016). Wavelet transform analysis of skin perfusion during thermal stimulation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 64, 167–175.

Balaz, D., Komornikova, A., Kruzliak, P., Sabaka, P., Gaspar, L., Zulli, A., Kucera, M., Zvonicek, V., Sabo, J., Ambrozy, E., et al. (2015). Regional differences of vasodilatation and vasomotion response to local heating in human cutaneous microcirculation. *Vasa* 44, 458–465.

Balducci, S., Iacobellis, G., Parisi, L., Di Biase, N., Calandriello, E., Leonetti, F., and Fallucca, F. (2006). Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *J. Diabetes Complications* 20, 216–223.

Balducci, S., D’Errico, V., Haxhi, J., Sacchetti, M., Orlando, G., Cardelli, P., Vitale, M., Bollanti, L., Conti, F., Zanuso, S., et al. (2017). Effect of a Behavioral Intervention Strategy for Adoption and Maintenance of a Physically Active Lifestyle: The Italian Diabetes and Exercise Study 2 (IDES_2): A Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care* 40, 1444–1452.

Basit, A., Basit, K.A., Fawwad, A., Shaheen, F., Fatima, N., Petropoulos, I.N., Alam, U., and Malik, R.A. Vitamin D for the treatment of painful diabetic neuropathy.

Bassett, C.A.L., Pilla, A.A., and Pawluk (1977). A non-operative salvage of surgically-resistant pseudarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. *Clin. Orthop.* 128–143.

Battecha, K. (2017). Efficacy of pulsed electromagnetic field on pain and nerve conduction velocity in patients with diabetic neuropathy. *Bull. Fac. Phys. Ther.* 22, 9.

Bayliss, W.M. (1902). On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *J. Physiol.* 28, 220–231.

Beggs, J., Johnson, P. C., Olafsen, A., & Watkins, C. J. (1992). Innervation of the vasa nervorum: changes in human diabetics. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 51(6), 612–629.

Belcaro, G., and Nicolaidis, A.N. (1991). The Venoarteriolar Response in Diabetics. *Angiology* 42, 827–835.

- Bilal, N., Erdogan, M., Özbek, M., Çetinkalp, Ş., Karadeniz, M., Özgen, A.G., Saygılı, F., Yılmaz, C., Tüzün, M., and Kabalak, T. (2008). Increasing severity of cardiac autonomic neuropathy is associated with increasing prevalence of nephropathy, retinopathy, and peripheral neuropathy in Turkish type 2 diabetics. *J. Diabetes Complications* 22, 181–185.
- Bönhof, G.J., Herder, C., Strom, A., Papanas, N., Roden, M., and Ziegler, D. (2019). Emerging Biomarkers, Tools, and Treatments for Diabetic Polyneuropathy. *Endocr. Rev.* 40, 153–192.
- Bosi, E., Conti, M., Vermigli, C., Cazzetta, G., Peretti, E., Cordoni, M.C., Galimberti, G., and Scionti, L. (2005). Effectiveness of frequency-modulated electromagnetic neural stimulation in the treatment of painful diabetic neuropathy. *Diabetologia* 48, 817–823.
- Bosi, E., Bax, G., Scionti, L., Spallone, V., Tesfaye, S., Valensi, P., and Ziegler, D. (2013). Frequency-modulated electromagnetic neural stimulation (FREMS) as a treatment for symptomatic diabetic neuropathy: results from a double-blind, randomised, multicentre, long-term, placebo-controlled clinical trial. *Diabetologia* 56, 467–475.
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J., et al. (2004). Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory: *Pain* 108, 248–257.
- Bouhassira, D., Attal, N., Alchaar, H., Boureau, F., Brochet, B., Bruxelle, J., Cunin, G., Fermanian, J., Ginies, P., Grun-Overdyking, A., et al. (2005). Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4): *Pain* 114, 29–36.
- Bouhassira, D., Letanoux, M., and Hartemann, A. (2013). Chronic Pain with Neuropathic Characteristics in Diabetic Patients: A French Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* 8, e74195.
- Boulton, A.J.M., Vinik, A.I., Arezzo, J.C., Bril, V., Feldman, E.L., Freeman, R., Malik, R.A., Maser, R.E., Sosenko, J.M., and Ziegler, D. (2005). Diabetic Neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28, 956–962.
- Bracic, M., and Stefanovska, A. Wavelet-based Analysis of Human Blood-flow Dynamics. *FLow Dyn.* 17.
- Braverman, I.M. (2000). The Cutaneous Microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 3–9.
- Bril, V., England, J.D., Franklin, G.M., Backonja, M., Cohen, J.A., Del Toro, D.R., Feldman, E.L., Iverson, D.J., Perkins, B., and Russell, J.W. (2011). Evidence-based guideline: Treatment of painful diabetic neuropathy—report of the american association of neuromuscular and electrodiagnostic medicine, the american academy of neurology, and the american academy of physical medicine & rehabilitation. *Muscle Nerve* 43, 910–917.
- Brunt, V.E., and Minson, C.T. (2011). Cutaneous thermal hyperemia: more than skin deep. *J. Appl. Physiol.* 111, 5–7.
- Bus, S.A., van Netten, J.J., Lavery, L.A., Monteiro-Soares, M., Rasmussen, A., Jubiz, Y., Price, P.E., and on behalf of the International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF) (2016).

IWGDF guidance on the prevention of foot ulcers in at-risk patients with diabetes: IWGDF Guidance on the Prevention of Foot Ulcers. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 32, 16–24.

~ C ~

Cacciatori, V., Dellera, A., Bellavere, F., Bongiovanni, L.G., Teatini, F., Gemma, M.L., and Muggeo, M. (1997). Comparative Assessment of Peripheral Sympathetic Function by Postural Vasoconstriction Arteriolar Reflex and Sympathetic Skin Response in NIDDM Patients. *Am. J. Med.* 102, 365–370.

Callaghan, B.C., Gao, L., Li, Y., Zhou, X., Reynolds, E., Banerjee, M., Pop-Busui, R., Feldman, E.L., and Ji, L. (2018). Diabetes and obesity are the main metabolic drivers of peripheral neuropathy. *Ann Clin Transl Neurol* 5, 397–405.

Callaghan, B.C., Reynolds, E., Banerjee, M., Chant, E., Villegas-Umana, E., and Feldman, E.L. (2020). Central Obesity is Associated With Neuropathy in the Severely Obese. *Mayo Clin. Proc.* 95, 1342–1353.

Callaghan, M.J., Chang, E.I., Seiser, N., Aarabi, S., Ghali, S., Kinnucan, E.R., Simon, B.J., and Gurtner, G.C. (2008). Pulsed Electromagnetic Fields Accelerate Normal and Diabetic Wound Healing by Increasing Endogenous FGF-2 Release: *Plast. Reconstr. Surg.* 121, 130–141.

Cameron, N.E., Eaton, S.E.M., Cotter, M.A., and Tesfaye, S. (2001). Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44, 1973–1988.

Cankar, K., Music, M., and Finderle, Z. (2016). Cutaneous microvascular response during local cold exposure - the effect of female sex hormones and cold perception. *Microvascular Research* 108, 34–40.

Cavanagh, P.R., Young, M.J., Adams, J.E., Vickers, K.L., and Boulton, A.J.M. (1994). Radiographic Abnormalities in the Feet of Patients With Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care* 17, 201–209.

Chao, C.Y.L., and Cheing, G.L.Y. (2009). Microvascular dysfunction in diabetic foot disease and ulceration. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25, 604–614.

Chapouly, C., Yao, Q., Vandierdonck, S., Larrieu-Lahargue, F., Mariani, J.N., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. (2016). Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 109, 217–227.

Charkoudian, N., Eisenach, J.H., Atkinson, J.L.D., Fealey, R.D., and Joyner, M.J. (2002). Effects of chronic sympathectomy on locally mediated cutaneous vasodilation in humans. *J. Appl. Physiol.* 92, 685–690.

Chassaing, C., Schmidt, J., Eschalier, A., Cardot, J.M., and Dubray, C. (2006). Hyperalgesia induced by cutaneous freeze injury for testing analgesics in healthy volunteers: Hyperalgesia induced by cutaneous freeze injury for testing analgesics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61, 389–397.

Chawla, A., Bhasin, G., and Chawla, R. Validation Of Neuropathy Symptoms Score (NSS) And Neuropathy Disability Score (NDS) In The Clinical Diagnosis Of Peripheral Neuropathy In Middle Aged People With Diabetes.

Cheing, G.L.-Y., Li, X., Huang, L., Kwan, R.L.-C., and Cheung, K.-K. (2014). Pulsed electromagnetic fields (PEMF) promote early wound healing and myofibroblast proliferation in diabetic rats. *Bioelectromagnetics* 35, 161–169.

Chen, L., Duan, X., Xing, F., Liu, G., Gong, M., Li, L., Chen, R., and Xiang, Z. (2019). Effects of pulsed electromagnetic field therapy on pain, stiffness and physical function in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Rehabil. Med.*

Cheng, Y.J., Gregg, E.W., Kahn, H.S., Williams, D.E., De Rekeneire, N., and Narayan, K.M.V. (2006). Peripheral Insensate Neuropathy—A Tall Problem for US Adults? *Am. J. Epidemiol.* 164, 873–880.

Choi, M.-C., Cheung, K.-K., Li, X., and Cheing, G.L.-Y. (2016). Pulsed electromagnetic field (PEMF) promotes collagen fibre deposition associated with increased myofibroblast population in the early healing phase of diabetic wound. *Arch. Dermatol. Res.* 308, 21–29.

Clough, G.F., Kuliga, K.Z., and Chipperfield, A.J. (2017). Flow motion dynamics of microvascular blood flow and oxygenation: Evidence of adaptive changes in obesity and type 2 diabetes mellitus/insulin resistance. *Microcirculation* 24, e12331.

CNAM (2017). Propositions sur la prise en charge du pied diabétique.

Cohen, N.D., Dunstan, D.W., Robinson, C., Vulikh, E., Zimmet, P.Z., and Shaw, J.E. (2008). Improved endothelial function following a 14-month resistance exercise training program in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 79, 405–411.

Colberg, S.R., Parson, H.K., Holton, D.R., Nunnold, T., and Vinik, A.I. (2003). Cutaneous Blood Flow in Type 2 Diabetic Individuals After an Acute Bout of Maximal Exercise. *Diabetes Care* 26, 1883–1888.

Colberg, S.R., Parson, H.K., Nunnold, T., Herriott, M.T., and Vinik, A.I. (2006). Effect of an 8-week resistance training program on cutaneous perfusion in type 2 diabetes. *Microvasc. Res.* 71, 121–127.

Colberg, S.R., Sigal, R.J., Yardley, J.E., Riddell, M.C., Dunstan, D.W., Dempsey, P.C., Horton, E.S., Castorino, K., and Tate, D.F. (2016). Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 39, 2065–2079.

Cracowski, J.-L., and Roustit, M. (2020). Human Skin Microcirculation. In *Comprehensive Physiology*, (American Cancer Society), pp. 1105–1154.

Crandall, C.G., Shibasaki, M., and Yen, T.C. (2002). Evidence that the human cutaneous venoarteriolar response is not mediated by adrenergic mechanisms. *J. Physiol.* 538, 599–605.

Crinière, L., Lhommet, C., Caille, A., Giraudeau, B., Lecomte, P., Couet, C., Oppert, J.-M., and Jacobi, D. (2011). Reproducibility and Validity of the French Version of the Long International Physical Activity Questionnaire in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Phys. Act. Health* 8, 858–865.

~ D ~

Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 367(9513), 847-858.

Danigo, A., Magy, L., and Demiot, C. (2013). TRPV1 dans les neuropathies douloureuses: Des modèles animaux aux perspectives thérapeutiques. *médecine/sciences* 29, 597–606.

Danne, T., Nimri, R., Battelino, T., Bergenstal, R.M., Close, K.L., DeVries, J.H., Garg, S., Heinemann, L., Hirsch, I., Amiel, S.A., et al. (2017). International Consensus on Use of Continuous Glucose Monitoring. *Diabetes Care* 40, 1631–1640.

Dasevcimen, N., and King, G. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological Research* 55, 498–510.

Davies, M., Brophy, S., Williams, R., and Taylor, A. (2006). The Prevalence, Severity, and Impact of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29, 1518–1522.

Davison, J.L., Short, D.S., and Wilson, T.E. Effect of local heating and vasodilation on the cutaneous venoarteriolar response.

Del Pozzi, A.T., Miller, J.T., and Hodges, G.J. (2016). The effect of heating rate on the cutaneous vasomotion responses of forearm and leg skin in humans. *Microvasc. Res.* 105, 77–84.

Demachi, K., Yoshida, T., Kume, M., Tsuji, M., and Tsuneoka, H. (2013). The influence of internal and skin temperatures on active cutaneous vasodilation under different levels of exercise and ambient temperatures in humans. *Int. J. Biometeorol.* 57, 589–596.

Dennis, R. (2019). Why so much confusion about PEMF? *1*, 12.

Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M., and Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Phys. Ther.* 88, 1254–1264.

Diniz, P., Soejima, K., and Ito, G. (2002). Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 7, 18–23.

Doupis, J., Lyons, T.E., Wu, S., Gnardellis, C., Dinh, T., and Veves, A. (2009). Microvascular Reactivity and Inflammatory Cytokines in Painful and Painless Peripheral Diabetic Neuropathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2157–2163.

Dreyfuss, C., Wauters, A., Adamopoulos, D., Pochet, S., Azarkan, M., Berkenboom, G., van de Borne, P., and Argacha, J.F. (2013). L-NAME Iontophoresis: A Tool to Assess NO-mediated Vasoreactivity During Thermal Hyperemic Vasodilation in Humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 61, 361–368.

Dros, J., Wewerinke, A., Bindels, P.J., and van Weert, H.C. (2009). Accuracy of Monofilament Testing to Diagnose Peripheral Neuropathy: A Systematic Review. *Ann. Fam. Med.* 7, 555–558.

Durand, S., Zhang, R., Cui, J., Wilson, T.E., and Crandall, C.G. (2004). Evidence of a myogenic response in vasomotor control of forearm and palm cutaneous microcirculations. *J. Appl. Physiol.* 97, 535–539.

Dyck, P.J. (1988). Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: Assessed in diabetics. *Muscle Nerve* 11, 21–32.

Dyck, P.J., Karnes, J.L., Daube, J., O'Brien, P., and Service, F.J. (1985). Clinical and neuropathological criteria for the diagnosis and staging of diabetic polyneuropathy. *Brain* 108, 861–880.

Dyck, P.J., Kratz, K.M., Karnes, J.L., Litchy, W.J., Klein, R., Pach, J.M., Wilson, D.M., O'Brien, P.C., Melton, L.J., and Service, F.J. (1993). The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 43, 817–824.

~ E ~

Ewing, D.J., Martyn, C.N., Young, R.J., and Clarke, B.F. (1985). The Value of Cardiovascular Autonomic Function Tests: 10 Years Experience in Diabetes. *Diabetes Care* 8, 491–498.

~ F ~

Feldman, E.L., Stevens, M.J., Thomas, P.K., Brown, M.B., Canal, N., and Greene, D.A. (1994). A Practical Two-Step Quantitative Clinical and Electrophysiological Assessment for the Diagnosis and Staging of Diabetic Neuropathy. *DIABETES CARE* 17, 9.

Feldman, E.L., Callaghan, B.C., Pop-Busui, R., Zochodne, D.W., Wright, D.E., Bennett, D.L., Bril, V., Russell, J.W., and Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5.

Féltou, M., and Vanhoutte, P.M. (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 291, H985–H1002.

Féltou, M., Busse, R., Edwards, G., Fleming, I., Weston, A.H., and Vanhoutte, P.M. (2003). Dialogue entre cellules endothéliales et cellules musculaires lisses. *médecine/sciences* 19, 1242–1250.

Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., et al. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 14, 162–173.

Fitzgerald, S.M., Kemp-Harper, B.K., Parkington, H.C., Head, G.A., and Evans, R.G. (2007). Endothelial dysfunction and arterial pressure regulation during early diabetes in mice: roles for nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R707–R713.

Fuchs, D., Dupon, P.P., Schaap, L.A., and Draijer, R. (2017). The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction non-invasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: a systematic review with meta-analysis. *Cardiovasc. Diabetol.* 16.

Fujii, N., McGarr, G.W., McNeely, B.D., Ichinose, M., Nishiyasu, T., and Kenny, G.P. (2020). KCa and KV channels modulate the venoarteriolar reflex in non-glabrous human skin with no roles of KATP channels, NOS, and COX. *Eur. J. Pharmacol.* 866, 172828.

Funk, R.H.W., Knels, L., Augstein, A., Marquetant, R., and Dertinger, H.F. (2014). Potent Stimulation of Blood Flow in Fingers of Volunteers after Local Short-Term Treatment with Low-Frequency Magnetic Fields from a Novel Device. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 1–9.

~ G ~

Galosi Differential involvement of myelinated and unmyelinated nerve fibers in painful diabetic polyneuropathy.

Gautier, J.F., Cahagne, B., Edan, G., Balarac, N., Halimi, S., and Allannic, H. (1997). Neuropathie diabétique périphérique. 23, 9.

Gin, H., and Rigalleau, V. (2002). Dépistage de la neuropathie périphérique : quels outils ? *Diabetes Metab* 28, 5.

Gonçalves, D., Rebelo, V., Barbosa, P., and Gomes, A. (2020). 8% Capsaicin Patch in Treatment of Peripheral Neuropathic Pain. *Pain Physician* 8.

Gonçalves, N.P., Vægter, C.B., and Pallesen, L.T. (2018). Peripheral Glial Cells in the Development of Diabetic Neuropathy. *Front. Neurol.* 9, 268.

Gore, M., Brandenburg, N.A., Dukes, E., Hoffman, D.L., Tai, K.-S., and Stacey, B. (2005). Pain Severity in Diabetic Peripheral Neuropathy is Associated with Patient Functioning, Symptom Levels of Anxiety and Depression, and Sleep. *J. Pain Symptom Manage.* 30, 374–385.

Gore, M., Brandenburg, N., Dukes, E., Hoffman, D., Snyder-Chavis, A., Tai, K., Fernando, S., Ryan, M., Gordon, L., Gordon, A., et al. (2014). Pain severity in diabetic peripheral neuropathy (DPN) impacts patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep.

Gould, J. (2018). Superpowered skin. *Nature* 563, S84–S85.

Graak, V., Chaudhary, S., Bal, B.S., and Sandhu, J.S. (2009). Evaluation of the efficacy of pulsed electromagnetic field in the management of patients with diabetic polyneuropathy. *Int. J. Diabetes Dev. Ctries.* 29, 56–61.

Green, D.J., Hopman, M.T.E., Padilla, J., Laughlin, M.H., and Thijssen, D.H.J. (2017). Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli. *Physiol. Rev.* 97, 495–528.

Grimaldi, A. (2010). Le diabète de type 2.

Groener, J.B., Jende, J.M.E., Kurz, F.T., Kender, Z., Schuh-Hofer, S., Nawroth, P.P., Bendszus, M., and Kopf, S. Understanding diabetic neuropathy: from subclinical nerve lesions to severe nerve fiber deficits. A cross-sectional study in patients with type 2 diabetes and healthy controls. 39.

Gylfadottir, S.S., Weerachoenkul, D., Andersen, S.T., Niruthisard, S., Suwanwalaikorn, S., and Jensen, T.S. (2019). Painful and non-painful diabetic polyneuropathy: Clinical characteristics and diagnostic issues. *J. Diabetes Investig.*

~ H ~

Häfner, H.-M., Bräuer, K., Eichner, M., Koch, I., Heinle, H., Röcken, M., and Strölin, A. (2007). Wavelet Analysis of Skin Perfusion in Healthy Volunteers. *Microcirculation* 14, 137–144.

Hamdy, O., Abou-Elenin, K., LoGerfo, F.W., Horton, E.S., and Veves, A. (2001). Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care* 24, 344–349.

Hartemann, A., and Lozeron, P. (2015). Les neuropathies périphériques chez les diabétiques. 74, 4.

HAS (2007). Prise en charge diagnostique des neuropathies périphériques (polyneuropathies et mononeuropathies multiples).

HAS (2010). Dépistage de la rétinopathie diabétique par lecture différée de photographies du fond d'œil.

HAS (2012). Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique.

Henriksen, O., and Sejrsen, P. (1976). Local Reflex in Microcirculation in Human Cutaneous Tissue. *Acta Physiol. Scand.* 98, 227–231.

Hodges, G.J., and Del Pozzi, A.T. (2014). Noninvasive examination of endothelial, sympathetic, and myogenic contributions to regional differences in the human cutaneous microcirculation. *Microvasc. Res.* 93, 87–91.

Hodges, G.J., Mallette, M.M., Martin, Z.T., and Del Pozzi, A.T. (2017a). Effect of sympathetic nerve blockade on low-frequency oscillations of forearm and leg skin blood flow in healthy humans. *Microcirculation* 24, e12388.

Hodges, G.J., Mallette, M.M., Martin, Z.T., and Del Pozzi, A.T. (2017b). Effect of sympathetic nerve blockade on low-frequency oscillations of forearm and leg skin blood flow in healthy humans. *Microcirculation* 24, e12388.

Hodges, G.J., Klentrou, P., Cheung, S.S., and Falk, B. (2019a). Comparison of laser speckle contrast imaging and laser-Doppler fluxmetry in boys and men. *Microvasc. Res.* 103927.

Hodges, G.J., Mallette, M.M., and Cheung, S.S. (2019b). The reliability of cutaneous low-frequency oscillations in young healthy males. *Microcirculation* e12546.

Holowatz, L.A. (2008). Human cutaneous microvascular ageing: potential insights into underlying physiological mechanisms of endothelial function and dysfunction. *J. Physiol.* 586, 3301–3301.

Holowatz, L.A., Thompson-Torgerson, C.S., and Kenney, W.L. (2008). The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J. Appl. Physiol.* 105, 370–372.

Houben, A.J.H.M., Slaaf, D.W., Huvers, F.C., De Leeuw, P.W., Kruseman, A.C.N., and Schaper, N.C. (1994). Diurnal variations in total forearm and skin microcirculatory blood flow in man. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 54, 161–168.

Høyer, C., Sandermann, J., and Petersen, L.J. (2013). The toe-brachial index in the diagnosis of peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 58, 231–238.

Hu, H.-F., Hsiu, H., Sung, C.-J., and Lee, C.-H. (2017). Combining laser-Doppler flowmetry measurements with spectral analysis to study different microcirculatory effects in human prediabetic and diabetic subjects. *Lasers Med. Sci.* 32, 327–334.

Humeau-Heurtier, A., Mahe, G., Durand, S., and Abraham, P. (2012). Multiscale Entropy Study of Medical Laser Speckle Contrast Images. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 60.

Humeau-Heurtier, A., Mahe, G., Durand, S., and Abraham, P. (2013). Skin perfusion evaluation between laser speckle contrast imaging and laser Doppler flowmetry. *Opt. Commun.* 291, 482–487.

~ I ~

Iatsenko, D., McClintock, P.V.E., and Stefanovska, A. (2015). Linear and synchrosqueezed time–frequency representations revisited: Overview, standards of use, resolution, reconstruction, concentration, and algorithms. *Digit. Signal Process.* 42, 1–26.

Ieran, M., Zaffuto, S., Bagnacani, M., Annovi, M., Moratti, A., and Cadossi, R. (1990). Effect of low frequency pulsing electromagnetic fields on skin ulcers of venous origin in humans: A double-blind study. *J. Orthop. Res.* 8, 276–282.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes atlas*. 9th ed. (2019)

Iqbal, Z. (2018). *Diabetic Peripheral Neuropathy_ Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy*. *Clin. Ther.* 40, 22.

Iwase, M., Imoto, H., Murata, A., Nakamura, U., Nohara, S., Uchizono, Y., Iino, K., and Iida, M. (2007). Altered Postural Regulation of Foot Skin Oxygenation and Blood Flow in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 115, 444–447.

~ J ~

Jan, Y.-K., Brienza, D.M., and Geyer, M.J. (2005). Analysis of week-to-week variability in skin blood flow measurements using wavelet transforms. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* 25, 253–262.

Jan, Y.-K., Shen, S., Foreman, R.D., and Ennis, W.J. (2013). Skin blood flow response to locally applied mechanical and thermal stresses in the diabetic foot. *Microvasc. Res.* 89, 40–46.

- Jan, Y.-K., Liao, F., Cheing, G.L.Y., Pu, F., Ren, W., and Choi, H.M.C. (2019). Differences in skin blood flow oscillations between the plantar and dorsal foot in people with diabetes mellitus and peripheral neuropathy. *Microvasc. Res.* *122*, 45–51.
- Janevic, M. R., McLaughlin, S. J., & Connell, C. M. (2013). The association of diabetes complications with physical activity in a representative sample of older adults in the United States. *Chronic illness*, *9*(4), 251-257.
- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S.C., and Treede, R.-D. (2011). A new definition of neuropathic pain: *Pain* *152*, 2204–2205.
- Johnson, P. C. (1991). The myogenic response. In *The resistance vasculature* (pp. 159-168). Humana Press, Totowa, NJ.
- Johnson, J.M., Minson, C.T., and Kellogg, D.L. (2014). Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 33–89.
- de Jongh, R.T., Serné, E.H., IJzerman, R.G., Jørstad, H.T., and Stehouwer, C.D.A. (2008). Impaired local microvascular vasodilatory effects of insulin and reduced skin microvascular vasomotion in obese women. *Microvasc. Res.* *75*, 256–262.
- Jonk, A.M., Houben, A.J.H.M., de Jongh, R.T., Serné, E.H., Schaper, N.C., and Stehouwer, C.D.A. (2007). Microvascular Dysfunction in Obesity: A Potential Mechanism in the Pathogenesis of Obesity-Associated Insulin Resistance and Hypertension. *Physiology* *22*, 252–260.
- Jörneskog, G., Brismar, K., and Fagrell, B. (1995). Skin capillary circulation severely impaired in toes of patients with IDDM, with and without late diabetic complications. *Diabetologia* *38*, 474–480.
- Journeay, W.S., Reardon, F.D., Martin, C.R., and Kenny, G.P. (2004). Control of cutaneous vascular conductance and sweating during recovery from dynamic exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* *96*, 2207–2212.
- Jude, E.B., Boulton, A.J.M., Ferguson, M.W.J., and Appleton, I. (1999). The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1. *Diabetologia* *42*, 748–757.
- Jude, E.B., Oyibo, S.O., Chalmers, N., and Boulton, A.J.M. (2001). Peripheral Arterial Disease in Diabetic and Nondiabetic Patients: A comparison of severity and outcome. *Diabetes Care* *24*, 1433–1437.

~ K ~

- Karonova, T., Stepanova, A., Bystrova, A., and Jude, E.B. (2020). High-Dose Vitamin D Supplementation Improves Microcirculation and Reduces Inflammation in Diabetic Neuropathy Patients. *Nutrients* *12*, 2518.

- Kavak, S., Emre, M., Meral, I., Unlugenc, H., Pelit, A., and Demirkazik, A. (2009). Repetitive 50 Hz pulsed electromagnetic field ameliorates the diabetes-induced impairments in the relaxation response of rat thoracic aorta rings. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 672–679.
- Kellogg, D.L., Johnson, J.M., and Kosiba, W.A. (1991). Competition between cutaneous active vasoconstriction and active vasodilation during exercise in humans. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 261, H1184–H1189.
- Kellogg, D.L., Zhao, J.L., and Wu, Y. (2009). Roles of nitric oxide synthase isoforms in cutaneous vasodilation induced by local warming of the skin and whole body heat stress in humans. *J. Appl. Physiol.* 107, 1438–1444.
- Khiabani, H. Z., Anvar, M. D., Kroese, A. J., & Strandén, E. (2000, January). The role of the veno-arteriolar reflex (VAR) in the pathogenesis of peripheral oedema in patients with chronic critical limb ischaemia (CLI). In *Annales chirurgiae et gynaecologiae* (Vol. 89, No. 2, pp. 93-98). Helsinki: Suomalainen Laakariseura Duodecim, 1976-2001.
- Kim, C.-H., Wheatley-Guy, C.M., Stewart, G.M., Yeo, D., Shen, W.-K., and Johnson, B.D. (2020). The impact of pulsed electromagnetic field therapy on blood pressure and circulating nitric oxide levels: a double blind, randomized study in subjects with metabolic syndrome. *Blood Press.* 29, 47–54.
- Kim, J., Montagnani, M., Koh, K.K., and Quon, M.J. (2006). Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Molecular and Pathophysiological Mechanisms. *Circulation* 113, 1888–1904.
- Kissela, B.M., Khoury, J., Kleindorfer, D., Woo, D., Schneider, A., Alwell, K., Miller, R., Ewing, I., Moomaw, C.J., Szaflarski, J.P., et al. (2005). Epidemiology of Ischemic Stroke in Patients With Diabetes. *Diabetes care* 28, 5.
- Körei, A.E., Istenes, I., Papanas, N., and Kempfer, P. (2016). Small-Fiber Neuropathy: A Diabetic Microvascular Complication of Special Clinical, Diagnostic, and Prognostic Importance. *Angiology* 67, 49–57.
- Krishnan, S.T.M., and Rayman, G. (2004). The LDIflare: A novel test of C-fiber function demonstrates early neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 2930–2935.
- Krupatkin, A.I. (2006). The influence of the sympathetic innervation on the skin microvascular tone and blood flow oscillations. *Hum. Physiol.* 32, 584–592.
- Krupatkin, A.I. (2009). Blood flow oscillations at a frequency of about 0.1 Hz in skin microvessels do not reflect the sympathetic regulation of their tone. *Hum. Physiol.* 35, 183–191.
- Kubat, N., Moffett, J., and Fray, L. (2015). Effect of pulsed electromagnetic field treatment on programmed resolution of inflammation pathway markers in human cells in culture. *J. Inflamm. Res.* 59.
- Kusano, K.F., Allendoerfer, K.L., Munger, W., Pola, R., Bosch-Marce, M., Kirchmair, R., Yoon, Y., Curry, C., Silver, M., Kearney, M., et al. (2004). Sonic Hedgehog Induces Arteriogenesis in Diabetic Vasa Nervorum and Restores Function in Diabetic Neuropathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2102–2107.

Kvandal, P., Stefanovska, A., Veber, M., Désirée Kvernmo, H., and Arvid Kirkebøen, K. (2003). Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines. *Microvasc. Res.* 65, 160–171.

Kvandal, P., Landsverk, S.A., Bernjak, A., Stefanovska, A., Kvernmo, H.D., and Kirkebøen, K.A. (2006). Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc. Res.* 72, 120–127.

Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Bracic, M., Kirkebøen, K.A., and Kvernebo, K. (1998). Spectral Analysis of the Laser Doppler Perfusion Signal in Human Skin before and after Exercise. *Microvasc. Res.* 56, 173–182.

Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Kirkebøen, K.A., and Kvernebo, K. (1999). Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvasc. Res.* 57, 298–309.

Kwan, R., Lu, S., Choi, H., Kloth, L., and Cheing, G. (2019). Efficacy of Biophysical Energies on Healing of Diabetic Skin Wounds in Cell Studies and Animal Experimental Models: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 368.

Kwan, R.L.-C., Wong, W.-C., Yip, S.-L., Chan, K.-L., Zheng, Y.-P., and Cheing, G.L.-Y. (2015). Pulsed Electromagnetic Field Therapy Promotes Healing and Microcirculation of Chronic Diabetic Foot Ulcers: A Pilot Study. *Adv. Skin Wound Care* 28, 212–219.

~ L ~

Lam, H. C. (2001). Role of endothelin in diabetic vascular complications. *Endocrine*, 14(3), 277–284.

Lauria, G., and Devigili, G. (2007). Skin biopsy as a diagnostic tool in peripheral neuropathy. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3, 546–557.

Le Bars, D., and Adam, F. (2002). Nocicepteurs et médiateurs dans la douleur aiguë inflammatoire. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 21, 315–335.

Lee, J.-H., Lee, R., Hwang, M.-H., Hamilton, M.T., and Park, Y. (2018). The effects of exercise on vascular endothelial function in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol. Metab. Syndr.* 10, 15.

Lefrandt, J.D., Bosma, E., Oomen, P.H.N., van der Hoeven, J.H., van Roon, A.M., Smit, A.J., and Hoogenberg, K. (2003). Sympathetic mediated vasomotion and skin capillary permeability in diabetic patients with peripheral neuropathy. *Diabetologia* 46, 40–47.

Lei, T., Jing, D., Xie, K., Jiang, M., Li, F., Cai, J., Wu, X., Tang, C., Xu, Q., Liu, J., et al. (2013). Therapeutic Effects of 15 Hz Pulsed Electromagnetic Field on Diabetic Peripheral Neuropathy in Streptozotocin-Treated Rats. *PLoS ONE* 8, e61414.

Lenasi, H. (2014). Physical exercise and skin microcirculation. *Periodicum biologorum*, 116(1), 21–28.

Levey, A.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Iii, A.F.C., Feldman, H.I., Kusek, J.W., Eggers, P., and Coresh, J. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *10*.

Lewis, T. (1927). The blood vessels of the human skin and their responses. *Canadian Medical Association Journal*, 17(12), 1574.

Li, L., Mac-Mary, S., Marsaut, D., Sainthillier, J.M., Nouveau, S., Gharbi, T., de Lacharriere, O., and Humbert, P. (2006). Age-related changes in skin topography and microcirculation. *Arch Dermatol Res* 297, 412–416.

Li, S., Yu, B., Zhou, D., He, C., Zhuo, Q., and Hulme, J.M. (2013). Electromagnetic fields for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.*

Liao, F., and Jan, Y.-K. (2017). Nonlinear dynamics of skin blood flow response to mechanical and thermal stresses in the plantar foot of diabetics with peripheral neuropathy. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 66, 197–210.

Liao, F., Cheing, G., Ren, W., Jain, S., and Jan, Y.-K. (2018). Application of Multiscale Entropy in Assessing Plantar Skin Blood Flow Dynamics in Diabetics with Peripheral Neuropathy. *Entropy* 20, 127.

Lin, Y., Nishimura, R., Nozaki, K., Sasaki, N., Kadosawa, T., Goto, N. ... & Takeuchi, A. (1993). Collagen production and maturation at the experimental ligament defect stimulated by pulsing electromagnetic fields in rabbits. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55(4), 527-531.

Loader, J., Khouri, C., Taylor, F., Stewart, S., Lorenzen, C., Cracowski, J.-L., Walther, G., and Roustit, M. (2019). The continuums of impairment in vascular reactivity across the spectrum of cardiometabolic health: A systematic review and network meta-analysis. *Obes. Rev.* 20, 906–920.

Loirand, G., Lompré, A.-M., Savineau, J.-P., and Pacaud, P. Tonus des muscles lisses vasculaires : transmissions du signal dépendantes et indépendantes du Ca²⁺. *13*, 11.

Lozeron, P., and Kubis, N. (2015). Prise en charge de la douleur neuropathique. *Rev. Médecine Interne* 36, 480–486.

Lozeron, P., Mantsounga, C.S., Broqueres-You, D., Dohan, A., Polivka, M., Deroide, N., Silvestre, J.-S., Kubis, N., and Lévy, B.I. (2015). Characterization of nerve and microvessel damage and recovery in type 1 diabetic mice after permanent femoral artery ligation: Diabetes: Nerve–Microvessel Coupling. *J. Neurosci. Res.* 93, 1451–1461.

~ M ~

Mahé, G., Haj-Yassin, F., Rousseau, P., Humeau, A., Durand, S., Leftheriotis, G., and Abraham, P. (2011). Distance between laser head and skin does not influence skin blood flow values recorded by laser speckle imaging. *Microvasc. Res.* 82, 439–442.

Mahé, G., Durand, S., Humeau-Heurtier, A., Leftheriotis, G., and Abraham, P. (2012a). Impact of Experimental Conditions on Noncontact Laser Recordings in Microvascular Studies: Experimental Conditions and Noncontact Laser Recordings. *Microcirculation* 19, 669–675.

- Mahé, G., Durand, S., Humeau, A., Leftheriotis, G., Rousseau, P., and Abraham, P. (2012b). Air movements interfere with laser speckle contrast imaging recordings. *Lasers in Medical Science* 27, 1073–1076.
- Mahe, G., Abraham, P., Le Faucheur, A., Bruneau, A., Humeau-Heurtier, A., and Durand, S. (2013). Cutaneous microvascular functional assessment during exercise: a novel approach using laser speckle contrast imaging. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* 465, 451–458.
- Malek, N., Pajak, A., Kolosowska, N., Kucharczyk, M., and Starowicz, K. (2015). The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Mol. Cell. Neurosci.* 65, 1–10.
- Malik, R.A. (2020). Diabetic neuropathy: A focus on small fibres. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 36, e3255.
- Malik, R.A., and Veves, A. (2005). Diabetic Neuropathy. In *Diabetes and Cardiovascular Disease*, M.T. Johnstone, and A. Veves, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 381–401.
- Malik, R.A., Tesfaye, S., Newrick, P.G., Walker, D., Rajbhandari, S.M., Siddique, I., Sharma, A.K., Boulton, A.J.M., King, R.H.M., Thomas, P.K., et al. (2005). Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia* 48, 578–585.
- Maranta, F., Cianfanelli, L., and Cianflone, D. (2020). *Glycaemic Control and Vascular Complications in Diabetes Mellitus Type 2*. (New York, NY: Springer US), p.
- Markov, M.S. (2005). “Biological Windows”: A Tribute to W. Ross Adey. *The Environmentalist* 25, 67–74.
- Markov, M.S. (2007). Magnetic Field Therapy: A Review. *Electromagn. Biol. Med.* 26, 1–23.
- Marso, S.P., and Hiatt, W.R. (2006). Peripheral Arterial Disease in Patients With Diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, 921–929.
- Martel, G.F., Andrews, S.C., and Roseboom, C.G. (2002). Comparison of static and placebo magnets on resting forearm blood flow in young, healthy men. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 32, 518–524.
- Martinez, V., Attal, N., Bouhassira, D., and Lantéri-Minet, M. (2010). Les douleurs neuropathiques chroniques : diagnostic, évaluation et traitement en médecine ambulatoire. Recommandations pour la pratique clinique de la Société française d’étude et de traitement de la douleur. *Douleurs Eval. - Diagn. - Trait.* 11, 3–21.
- Martini, R., and Bagno, A. (2018). The wavelet analysis for the assessment of microvascular function with the laser Doppler fluxmetry over the last 20 years. Looking for hidden informations. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 1–17.
- Mayrovitz, H. N., & Larsen, P. B. (1992). Effects of pulsed electromagnetic fields on skin microvascular blood perfusion. *Wounds*, 4(5), 197-202.

- Mayrovitz, H. N., & Larsen, P. B. (1995). A preliminary study to evaluate the effect of pulsed radio frequency field treatment on lower extremity peri-ulcer skin microcirculation of diabetic patients. *Wounds, 7*(3), 90-93.
- Mayrovitz, H.N., Groseclose, E.E., Markov, M., and Pilla, A.A. (2001). Effects of permanent magnets on resting skin blood perfusion in healthy persons assessed by laser Doppler flowmetry and imaging. *Bioelectromagnetics 22*, 494–502.
- McCormack, H.M., Horne, D.J. de L., and Sheather, S. (1988). Clinical applications of visual analogue scales: a critical review. *Psychol. Med. 18*, 1007–1019.
- McKay, J.C., Prato, F.S., and Thomas, A.W. (2007). A literature review: The effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetics 28*, 81–98.
- McKay, J.C., Corbacio, M., Tyml, K., Prato, F.S., and Thomas, A.W. (2009). Extremely low frequency pulsed electromagnetic field designed for antinociception does not affect microvascular responsiveness to the vasodilator acetylcholine. *Bioelectromagnetics*.
- McNamee, D.A., Corbacio, M., Weller, J.K., Brown, S., Prato, F.S., Thomas, A.W., and Legros, A.G. (2010). The cardiovascular response to an acute 1800- μ T, 60-Hz magnetic field exposure in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health 83*, 441–454.
- McNamee, D.A., Corbacio, M., Weller, J.K., Brown, S., Stodilka, R.Z., Prato, F.S., Bureau, Y., Thomas, A.W., and Legros, A.G. (2011). The response of the human circulatory system to an acute 200- μ T, 60-Hz magnetic field exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health 84*, 267–277.
- Meijer, J.-W.G., Smit, A.J., and Lefrandt, J.D. (2005). Back to Basics in Diagnosing Diabetic Polyneuropathy With the Tuning Fork! *Diabetes care 28*, 5.
- Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science, 150*(3699), 971-979.
- Mert, T. (2017). Pulsed magnetic field treatment as antineuropathic pain therapy. *Rev. Neurosci. 28*.
- Mert, T., Gunay, I., Gocmen, C., Kaya, M., and Polat, S. (2006). Regenerative effects of pulsed magnetic field on injured peripheral nerves. *Altern. Ther. Health Med. 12*.
- Mert, T., Gisi, G., Celik, A., Baran, F., Uremis, M.M., and Gunay, I. (2015). Frequency-dependent effects of sequenced pulsed magnetic field on experimental diabetic neuropathy. *Int. J. Radiat. Biol. 91*, 833–842.
- Miâdi-Messaoud, H., Chouchane, A., Ben, H.B., Debbabi, H., Ben-Jebria, A., and Tabka, Z. Six-Minute Walk Test Improved Forearm Skin Blood Flow in Tunisian Obese Women. *Obesity 20*, 1773–1779.
- Minson, C.T., Berry, L.T., and Joyner, M.J. (2001). Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J. Appl. Physiol. 91*, 1619–1626.

Mirkovic, V.B., Swearingin, B., Dail, T.K., Melton, D., Farbood, Y., Mansouri, S.M.T., Motamedi, F., Zhang, Y., Hu, H., Yu, T., et al. Non-Pharmacological Treatment Of Diabetic Polyneuropathy By Pulse Electromagnetic Field. 421.

Mitono, H., Endoh, H., Okazaki, K., Ichinose, T., Masuki, S., Takamata, A., and Nose, H. (2005). Acute hypoosmolality attenuates the suppression of cutaneous vasodilation with increased exercise intensity. *J. Appl. Physiol.* 99, 902–908.

Mizeva, I., Di Maria, C., Frick, P., Podtaev, S., and Allen, J. (2015). Quantifying the correlation between photoplethysmography and laser Doppler flowmetry microvascular low-frequency oscillations. *J. Biomed. Opt.* 20, 037007.

Mizeva, I., Zharkikh, E., Dremin, V., Zherebtsov, E., Makovik, I., Potapova, E., and Dunaev, A. (2017). Spectral analysis of the blood flow in the foot microvascular bed during thermal testing in patients with diabetes mellitus. *ArXiv170702110 Q-Bio*.

Mizeva, I., Dremin, V., Potapova, E., Zherebtsov, E., Kozlov, I., and Dunaev, A. (2019). Wavelet Analysis of the Temporal Dynamics of the Laser Speckle Contrast in Human Skin. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1–1.

Mohamed, R., Abdallah, G., Abdeen, H., and Nassif, A. (2017). Influence of low level laser therapy versus pulsed electromagnetic field on diabetic peripheral neuropathy. *Phys. Ther. Rehabil.* 4, 17.

Montero, D., Guillaume, W., Antonia, P.-M., Cristina, S., Enrique, R., Charles, M., and Agnès, V. (2014). Decreased microvascular myogenic response to insulin in severely obese adolescents. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 23–32.

Morlet, J. (1983). Sampling Theory and Wave Propagation. In *Issues in Acoustic Signal — Image Processing and Recognition*, C.H. Chen, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 233–261.

Multanen, J., Häkkinen, A., Heikkinen, P., Kautiainen, H., Mustalampi, S., and Ylinen, J. (2018). Pulsed electromagnetic field therapy in the treatment of pain and other symptoms in fibromyalgia: A randomized controlled study: BEMER Magnetic Field Therapy in Fibromyalgia. *Bioelectromagnetics* 39, 405–413.

Muris, D.M.J., Houben, A.J.H.M., Kroon, A.A., Henry, R., Kallen, C. v.d., Schaper, N., Sep, S., Koster, A., Castermans, P., Schram, M.T., et al. (2013). PS11 - 3. Age, waist circumference and blood pressure are associated with skin microvascular flow motion in a healthy population: the Maastricht Study. *Ned. Tijdschr. Voor Diabetol.* 11, 163–164.

Musaev, A.V., Guseinova, S.G., and Imamverdieva, S.S. (2003). The use of pulsed electromagnetic fields with complex modulation in the treatment of patients with diabetic polyneuropathy. *Neurosci. Behav. Physiol.* 33, 745–752.

~ N ~

Nabuurs-Franssen, H., and Schaper N. (2002). The effect of polyneuropathy on foot microcirculation in Type II diabetes. *Diabetologia* 45, 1164–1171.

Nagy, I., Sántha, P., Jancsó, G., and Urbán, L. (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur. J. Pharmacol.* *500*, 351–369.

Nathan, D.M., Barrett-Connor, E., Crandall, J.P., Edelstein, S.L., Goldberg, R.B., Horton, E.S., Knowler, W.C., Mather, K.J., Orchard, T.J., Pi-Sunyer, X., et al. (2015). Long-term Effects of Lifestyle Intervention or Metformin on Diabetes Development and Microvascular Complications: the DPP Outcomes Study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *3*, 866–875.

Negm, A., Lorbergs, A., and MacIntyre, N.J. (2013). Efficacy of low frequency pulsed subsensory threshold electrical stimulation vs placebo on pain and physical function in people with knee osteoarthritis: systematic review with meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* *21*, 1281–1289.

Nikolaeva, N.V., Bolotova, N.V., Luk'yanov, V.F., Raigorodskii, Y.M., and Tkacheva, E.N. (2010). Non-pharmacological correction of impaired microcirculation in children with diabetic polyneuropathy. *Neurosci. Behav. Physiol.* *40*, 347–350.



Öberg, P.Å., Tenland, T., and Nilsson, G.E. (1984). Laser-Doppler Flowmetry—a Non-invasive and Continuous Method for Blood Flow Evaluation in Microvascular Studies. *Acta Med. Scand.* *216*, 17–24.

O'Doherty, J., McNamara, P., Clancy, N.T., Enfield, J.G., and Leahy, M.J. (2009). Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J. Biomed. Opt.* *14*, 034025.

Ohkubo, C., and Okano, H. (2015). Magnetic field influences on the microcirculation. *Electromagn. Fields Biol Med* 103–128.

Okazaki, K., Fu, Q., Martini, E.R., Shook, R., Conner, C., Zhang, R., Crandall, C.G., and Levine, B.D. (2005). Vasoconstriction during venous congestion: effects of venoarteriolar response, myogenic reflexes, and hemodynamics of changing perfusion pressure. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *289*, R1354–R1359.

Olver, T.D., and Laughlin, M.H. (2016). Endurance, interval sprint, and resistance exercise training: impact on microvascular dysfunction in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *310*, H337–H350.

Orasanu, G., and Plutzky, J. (2009). The Pathologic Continuum of Diabetic Vascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* *53*, S35–S42.

Østergaard, L., Finnerup, N.B., Terkelsen, A.J., Olesen, R.A., Drasbek, K.R., Knudsen, L., Jespersen, S.N., Frystyk, J., Charles, M., Thomsen, R.W., et al. (2015). The effects of capillary dysfunction on oxygen and glucose extraction in diabetic neuropathy. *Diabetologia* *58*, 666–677.

~ P ~

- Pafili, K., Maltezos, E., and Papanas, N. (2017). NC-stat for the diagnosis of diabetic polyneuropathy. *Expert Rev. Med. Devices* *14*, 251–254.
- Pafili, K., Papanas, N., and Ziegler, D. (2018). Neuropathy in Diabetes: “One Cannot Begin It Too Soon.” *Angiology* *69*, 752–754.
- Pafili, K., Trypsianis, G., Papazoglou, D., Maltezos, E., and Papanas, N. (2019). Correlation of cardiac autonomic neuropathy with small and large peripheral nerve function in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *156*, 107844.
- Pafili, K., Trypsianis, G., Papazoglou, D., Maltezos, E., and Papanas, N. (2020). Clinical Tools for Peripheral Neuropathy to Exclude Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Ther.* *11*, 979–986.
- Pan, Y., Dong, Y., Hou, W., Ji, Z., Zhi, K., Yin, Z., Wen, H., and Chen, Y. (2013). Effects of PEMF on microcirculation and angiogenesis in a model of acute hindlimb ischemia in diabetic rats. *Bioelectromagnetics* *34*, 180–188.
- Panagopoulos, D.J., Karabarbounis, A., and Margaritis, L.H. (2002). Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *298*, 95–102.
- Paolucci, T., Pezzi, L., Centra, A.M., Giannandrea, N., Bellomo, R.G., and Saggini, R. (2020). Electromagnetic Field Therapy: A Rehabilitative Perspective in the Management of Musculoskeletal Pain – A Systematic Review. *J. Pain Res.* *13*, 1385–1400.
- Papanas, N., Vinik, A.I., and Ziegler, D. (2011). Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early? *Nat. Rev. Endocrinol.* *7*, 682–690.
- Park, H.S., Yun, H.M., Jung, I.M., and Lee, T. (2016). Role of Laser Doppler for the Evaluation of Pedal Microcirculatory Function in Diabetic Neuropathy Patients. *Microcirculation* *23*, 44–52.
- Parving, H. H., Viberti, G. C., Keen, H., Christiansen, J. S., & Lassen, N. A. (1983). Hemodynamic factors in the genesis of diabetic microangiopathy. *Metabolism*, *32*(9), 943-949.
- Passing, H., and Bablok, W. (1983). A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *Clin. Chem. Lab. Med.* *21*.
- Pergola, P.E., Kellogg, D.L., Johnson, J.M., Kosiba, W.A., and Solomon, D.E. (1993). Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *265*, H785–H792.
- Perkins, B.A., Grewal, J., Ng, E., Ngo, M., and Brill, V. (2006). Validation of a Novel Point-of-Care Nerve Conduction Device for the Detection of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy. *Diabetes Care* *29*, 2023–2027.

Pham, M., Oikonomou, D., Hornung, B., Weiler, M., Heiland, S., Bäumer, P., Kollmer, J., Nawroth, P.P., and Bendszus, M. (2015). Magnetic resonance neurography detects diabetic neuropathy early and with Proximal Predominance. *Ann. Neurol.* 78, 939–948.

Pilla, A.A. (2012). Electromagnetic fields instantaneously modulate nitric oxide signaling in challenged biological systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 426, 330–333.

Pilla, A.A. (2013). Nonthermal electromagnetic fields: From first messenger to therapeutic applications. *Electromagn. Biol. Med.* 32, 123–136.

Ponirakis, G., Odriozola, M.N., Odriozola, S., Petropoulos, I.N., Azmi, S., Fadavi, H., Alam, U., Asghar, O., Marshall, A., Miro, A., et al. (2016a). NerveCheck: An inexpensive quantitative sensory testing device for patients with diabetic neuropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 113, 101–107.

Ponirakis, G., Odriozola, M.N., Odriozola, S., Petropoulos, I.N., Azmi, S., Ferdousi, M., Fadavi, H., Alam, U., Marshall, A., Jeziorska, M., et al. (2016b). NerveCheck for the Detection of Sensory Loss and Neuropathic Pain in Diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 18, 800–805.

Pop-Busui, R. (2010). Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes. *DIABETES CARE* 33, 8.

Pop-Busui, R., Boulton, A.J.M., Feldman, E.L., Bril, V., Freeman, R., Malik, R.A., Sosenko, J.M., and Ziegler, D. (2017). Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 40, 136–154.

Potočník, N., and Lenasi, H. (2016). The responses of glabrous and nonglabrous skin microcirculation to graded dynamic exercise and its recovery. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 64, 65–75.

~ Q ~

Quattrini, C., Jeziorska, M., and Malik, R.A. (2004). Small Fiber Neuropathy in Diabetes: Clinical Consequence and Assessment. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* 3, 16–21.

~ R ~

Rayman, G., Hassan, A., and Tooke, J.E. (1986). Blood flow in the skin of the foot related to posture in diabetes mellitus. 292, 4.

Rigoard, P., Buffenoir, K., Wager, M., Bauche, S., Giot, J.-P., Robert, R., and Lapierre, F. (2009). Organisation anatomique et physiologique du nerf périphérique. *Neurochirurgie* 55, S3–S12.

Rohde, C., Chiang, A., Adipoju, O., Casper, D., and Pilla, A.A. (2010). Effects of Pulsed Electromagnetic Fields on Interleukin-1 β and Postoperative Pain: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Study in Breast Reduction Patients: *Plast. Reconstr. Surg.* 125, 1620–1629.

Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., and Steinhoff, M. (2006). Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiol. Rev.* 86, 1309–1379.

Rosales, W., Cofré, C., Alejandra, C., Bertona, C., Vizcaya, A., González, J., Bajuk, J., and Rodríguez, M. (2016). Validación de la escala de Borg en personas con diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Médica Chile* *144*, 1159–1163.

Rosenberger, D.C., Blechschmidt, V., Timmerman, H., Wolff, A., and Treede, R.-D. (2020). Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *J. Neural Transm.*

Rossi, M., Cupisti, A., Ricco, R., Santoro, G., Pentimone, F., and Carpi, A. (2004). Skin vasoreactivity to insulin iontophoresis is reduced in elderly subjects and is absent in treated non-insulin-dependent diabetes patients. *Biomed. Pharmacother.* *58*, 560–565.

Rossi, M., Maurizio, S., and Carpi, A. (2005). Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects. *Microvasc. Res.* *70*, 17–22.

Rossi, M., Santoro, G., Maurizio, S., and Carpi, A. (2006). Spectral Analysis of Skin Blood Flowmotion Before and After Exercise in Healthy Trained and in Sedentary Subjects. *Int. J. Sports Med.* *27*, 540–545.

Roussel, R. (2011). Histoire naturelle de la néphropathie diabétique. *Médecine Mal. Métaboliques* *5*, S8–S13.

Roustit, M., and Cracowski, J.-L. (2012). Non-invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight Into Methods. *Microcirculation* *19*, 47–64.

Roustit, M., and Cracowski, J.-L. (2013). Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* *34*, 373–384.

Roustit, M., Millet, C., Blaise, S., Dufournet, B., and Cracowski, J.L. (2010a). Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvasc. Res.* *80*, 505–511.

Roustit, M., Blaise, S., Millet, C., and Cracowski, J.L. (2010b). Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvasc. Res.* *79*, 102–108.

Roustit, M., Maggi, F., Isnard, S., Hellmann, M., Bakken, B., and Cracowski, J.-L. (2010c). Reproducibility of a local cooling test to assess microvascular function in human skin. *Microvasc. Res.* *79*, 34–39.

Roustit, M., Loader, J., Deusenberg, C., Baltzis, D., and Veves, A. (2016). Endothelial Dysfunction as a Link Between Cardiovascular Risk Factors and Peripheral Neuropathy in Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 3401–3408.

~ S ~

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A.A., Ogurtsova, K., et al. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *157*, 107843.

- Said, G. (2007). Diabetic neuropathy—a review. *Nat. Rev. Neurol.* 3, 331.
- Sasaki, H., and Kishimoto, S. (2020). Diagnostic strategy for diabetic polyneuropathy: Focus on nerve fiber type and magnetic resonance neurography. *J. Diabetes Investig.*
- Schlager, O., Giurgea, A., Hammer, A., Charwat-Resl, S., Margeta, C., Mueller, M., Ehringer, T., Zehetmayer, S., Willfort-Ehringer, A., Koppensteiner, R., et al. (2014). Impact of age and gender on microvascular function. *Eur J Clin Invest* 44, 766–774.
- Schmidt, J.A., Borgström, P., Bruttig, S.P., Fronek, A., and Intaglietta, M. (1993). Vasomotion as a Flow-Dependent Phenomenon. In *Progress in Applied Microcirculation*, C. Allegra, M. Intaglietta, and K. Messmer, eds. (S. Karger AG), pp. 34–51.
- Schmiedel, O., Schroeter, M.L., and Harvey, J.N. (2007). Microalbuminuria in Type 2 diabetes indicates impaired microvascular vasomotion and perfusion. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 293, H3424–H3431.
- Schuhfried, O., Vacariu, G., Rochowanski, H., Serek, M., and Fialka-Moser, V. (2005). The Effects of Low-Dosed and High-Dosed Low-Frequency Electromagnetic Fields on Microcirculation and Skin Temperature in Healthy Subjects. *Int. J. Sports Med.* 26, 886–890.
- Selvarajah, D., Heiberg-Gibbons, F., Wilkinson, I.D., Gandhi, R., and Tesfaye, S. (2018a). A Magnetic Resonance Imaging Volumetry Study of Regional Brain Atrophy in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes* 67.
- Selvarajah, D., Awadh, M., Gandhi, R., Wilkinson, I.D., and Tesfaye, S. (2018b). Alterations in Somatomotor Network Functional Connectivity in Painful Diabetic Neuropathy—A Resting State Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Diabetes* 67.
- Serne, E.H., IJzerman, R.G., Gans, R.O.B., Nijveldt, R., de Vries, G., Evertz, R., Donker, A.J.M., and Stehouwer, C.D.A. (2002). Direct Evidence for Insulin-Induced Capillary Recruitment in Skin of Healthy Subjects During Physiological Hyperinsulinemia. *Diabetes* 51, 1515–1522.
- Sharif, S., Raza, M.T., Mushtaq, S., Afreen, B., Hashmi, B.A., and Ali, M.H. Frequency of Depression in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and its Relationship with Glycemic Control and Diabetic Microvascular Complications. *Cureus* 11.
- Sharma, S., Schaper, N., and Rayman, G. (2020). Microangiopathy: Is it relevant to wound healing in diabetic foot disease? *Diabetes Metab. Res. Rev.* 36, e3244.
- Shaw, J.E., and Zimmet, P.Z. (1999). The epidemiology of diabetic neuropathy. *Diabetes Rev.* 7, 245–252.
- Shibasaki, M., Wilson, T.E., Cui, J., and Crandall, C.G. (2002). Acetylcholine released from cholinergic nerves contributes to cutaneous vasodilation during heat stress. *J. Appl. Physiol.* 93, 1947–1951.
- Shillo, P., Selvarajah, D., Greig, M., Gandhi, R., Rao, G., Wilkinson, I.D., Anand, P., and Tesfaye, S. (2019). Reduced vitamin D levels in painful diabetic peripheral neuropathy. *Diabet. Med.* 36, 44–51.

- Shupak, N.M., McKay, J.C., Nielson, W.R., Rollman, G.B., Prato, F.S., and Thomas, A.W. (2006). Exposure to a Specific Pulsed Low-Frequency Magnetic Field: A Double-Blind Placebo-Controlled Study of Effects on Pain Ratings in Rheumatoid Arthritis and Fibromyalgia Patients.
- Siemionow, M. (2004). Diabetic Neuropathy: Pathogenesis and Treatment. A Review. *J. Reconstr. Microsurg.* 20, 12.
- Silva, H., Ferreira, H.A., da Silva, H.P., and Monteiro Rodrigues, L. (2018). The Venoarteriolar Reflex Significantly Reduces Contralateral Perfusion as Part of the Lower Limb Circulatory Homeostasis in vivo. *Front. Physiol.* 9, 1123.
- Sjöström, L., Peltonen, M., Jacobson, P., Ahlin, S., Andersson-Assarsson, J., Anveden, Å., Bouchard, C., Carlsson, B., Karason, K., Lönroth, H., et al. (2014). Association of Bariatric Surgery With Long-term Remission of Type 2 Diabetes and With Microvascular and Macrovascular Complications. *JAMA* 311, 2297.
- Smith, T.L., Wong-Gibbons, D., and Maultsby, J. (2004). Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. *J. Orthop. Res.* 22, 80–84.
- Smith, S.A. (1982). Reduced sinus arrhythmia in diabetic autonomic neuropathy: diagnostic value of an age-related normal range. *BMJ* 285, 1599–1601.
- Snowling, N.J., and Hopkins, W.G. (2006). Effects of Different Modes of Exercise Training on Glucose Control and Risk Factors for Complications in Type 2 Diabetic Patients: A meta-analysis. *Diabetes Care* 29, 2518–2527.
- Snyder, K. a. M., Shamimi-Noori, S., Wilson, T.E., and Monahan, K.D. (2012). Age- and limb-related differences in the vasoconstrictor response to limb dependency are not mediated by a sympathetic mechanism in humans. *Acta Physiol.* 205, 372–380.
- Söderström, T., Stefanovska, A., Veber, M., and Svensson, H. (2003). Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 284, H1638–H1646.
- Sokolnicki, L.A., Roberts, S.K., Wilkins, B.W., Basu, A., and Charkoudian, N. (2007). Contribution of nitric oxide to cutaneous microvascular dilation in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 292, E314–E318.
- Spallone, V., Morganti, R., D'Amato, C., Greco, C., Cacciotti, L., and Marfia, G.A. (2012). Validation of DN4 as a screening tool for neuropathic pain in painful diabetic polyneuropathy: Validation of a screening tool for neuropathic pain in diabetes. *Diabet. Med.* 29, 578–585.
- Stefanovska, A., Bracic, M., and Kvernmo, H.D. (1999). Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 46, 1230–1239.
- Stewart, J.M., Taneja, I., Goligorsky, M.S., and Medow, M.S. (2007). Noninvasive Measure of Microvascular Nitric Oxide Function in Humans Using Very Low-Frequency Cutaneous Laser Doppler Flow Spectra. *Microcirculation* 14, 169–180.

Stewart, G. M., Wheatley-Guy, C. M., Johnson, B. D., Shen, W. K., & Kim, C. H. (2020). Impact of pulsed electromagnetic field therapy on vascular function and blood pressure in hypertensive individuals. *The Journal of Clinical Hypertension*, 22(6), 1083-1089.

Stiller, M.J., Pak, G.H., Shupack, J.L., Thaler, S., Kenny, C., and Jondreau, L. (1992). A portable pulsed electromagnetic field (PEMF) device to enhance healing of recalcitrant venous ulcers: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Br. J. Dermatol.* 127, 147–154.

Stirban, A. (2014). Microvascular Dysfunction in the Context of Diabetic Neuropathy. *Curr. Diab. Rep.* 14.

Stoyneva, Z., Velcheva, I., Antonova, N., Titianova, E., and Koleva, I. (2017). Venoarteriolar reflex responses in diabetic patients. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 65, 57–65.

Stranieri, A., Abawajy, J., Kelarev, A., Huda, S., Chowdhury, M., and Jelinek, H.F. (2013). An approach for Ewing test selection to support the clinical assessment of cardiac autonomic neuropathy. *Artificial Intelligence in Medicine* 58, 185–193.

Sun, J., Kwan, R.L.-C., Zheng, Y., and Cheing, G.L.-Y. (2016). Effects of pulsed electromagnetic fields on peripheral blood circulation in people with diabetes: A randomized controlled trial: PEMF on Circulation in People With Diabetes. *Bioelectromagnetics* 37, 290–297.

Sun, P.-C., Chen, C.-S., Kuo, C.-D., Lin, H.-D., Chan, R.-C., Kao, M.-J., and Wei, S.-H. (2012). Impaired microvascular flow motion in subclinical diabetic feet with sudomotor dysfunction. *Microvasc. Res.* 83, 243–248.

Sun, P.-C., Kuo, C.-D., Chi, L.-Y., Lin, H.-D., Wei, S.-H., and Chen, C.-S. (2013). Microcirculatory vasomotor changes are associated with severity of peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 10, 270–276.

~ T ~

Tao, R., and Huang, K. (2011). Reducing blood viscosity with magnetic fields. *Phys. Rev. E* 84.

Taylor, W.F., Johnson, J.M., O’Leary, D.S., and Park, M.K. (1984). Modification of the cutaneous vascular response to exercise by local skin temperature. *J. Appl. Physiol.* 57, 1878–1884.

Tesfaye, S., Ward, J.D., and Witte, D.R. (2005). Vascular Risk Factors and Diabetic Neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 10.

Tesfaye, S., Boulton, A.J.M., Dyck, P.J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempner, P., Lauria, G., Malik, R.A., Spallone, V., Vinik, A., et al. (2010). Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. *Diabetes Care* 33, 2285–2293.

Tew, G.A., Klonizakis, M., Moss, J., Ruddock, A.D., Saxton, J.M., and Hodges, G.J. (2011). Reproducibility of cutaneous thermal hyperaemia assessed by laser Doppler flowmetry in young and older adults. *Microvasc. Res.* 81, 177–182.

Themistocleous, A.C., Ramirez, J.D., Shillo, P.R., Lees, J.G., Selvarajah, D., Orengo, C., Tesfaye, S., Rice, A.S.C., and Bennett, D.L.H. (2016). The Pain in Neuropathy Study (PiNS): a cross-

sectional observational study determining the somatosensory phenotype of painful and painless diabetic neuropathy. *Pain* 157, 1132–1145.

Tomlinson, D.R., and Gardiner, N.J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 36–45.

Torrance, N., Elliott, A.M., Lee, A.J., and Smith, B.H. (2010). Severe chronic pain is associated with increased 10 year mortality. A cohort record linkage study. *Eur. J. Pain* 14, 380–386.

Troosters, T., Gosselink, R., & Decramer, M. (1999). Six minute walking distance in healthy elderly subjects. *European Respiratory Journal*, 14(2), 270-274.

Tudor-Locke, C.E., Bell, R.C., Myers, A.M., Harris, S.B., Lauzon, N., and Rodger, N.W. (2002). Pedometer-determined ambulatory activity in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 9.

Tuma, R. F., Durán, W. N., & Ley, K. (Eds.). (2011). *Microcirculation* (Vol. 4). Academic Press.

Turner, L.A., Tecklenburg-Lund, S., Chapman, R.F., Stager, J.M., Duke, J.W., and Mickleborough, T.D. (2013). Inspiratory loading and limb locomotor and respiratory muscle deoxygenation during cycling exercise. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 506–514.

~ U ~

Ueno, S., Lövsund, P., and Öberg, P. å. (1986). Effects of alternating magnetic fields and low-frequency electric currents on human skin blood flow. *Med. Biol. Eng. Comput.* 24, 57–61.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *The Lancet*, 352(9131), 854-865.

Urbancic-Rovan, V., Stefanovska, A., Bernjak, A., Ažman-Juvan, K., and Kocijančič, A. (2004). Skin Blood Flow in the Upper and Lower Extremities of Diabetic Patients with and without Autonomic Neuropathy. *J. Vasc. Res.* 41, 535–545.

~ V ~

Valensi, P., Sachs, R.-N., Harfouche, B., Lormeau, B., Paries, J., Cosson, E., Paycha, F., Leutenegger, M., and Attali, J.-R. (2001). Predictive Value of Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetic Patients With or Without Silent Myocardial Ischemia. *Diabetes Care* 24, 339–343.

Valentinuzzi, M.E. (2008). Magnetotherapy, alternative medicines, Hippocratic oath. *Biomed. Eng. OnLine* 7, 1.

Vanhoutte, P.M. (2003). Endothelial Control of Vasomotor Function. *Circ. J.* 67, 572–575.

Vas, P.R.J., and Edmonds, M.E. (2016). Early recognition of diabetic peripheral neuropathy and the need for one-stop microvascular assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 4, 723–725.

Veves, A., and Malik, R.A. (2008). *Diabetic Neuropathy: Clinical Management* (Springer Science & Business Media).

Veves, A., Akbari, C.M., Primavera, J., Donaghue, V.M., Zacharoulis, D., Chrzan, J.S., DeGirolami, U., LoGerfo, F.W., and Freeman, R. (1998). Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes* 47, 457–463.

Vinik, A.I. (1999). Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. *Am. J. Med.* 107, 17–26.

Vinik, A.I., and Mehrabyan, A. (2004). Diabetic neuropathies. *Med. Clin. North Am.* 88, 947–999.

Vinik, A.I., and Ziegler, D. (2007). Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Circulation* 115, 387–397.

Vinik, A.I., Nevoret, M.-L., Casellini, C., and Parson, H. (2013). Diabetic Neuropathy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 42, 747–787.

Vissing, S.F., Secher, N.H., and Victor, R.G. (1997). Mechanisms of cutaneous vasoconstriction during upright posture. *Acta Physiol. Scand.* 159, 131–138.

Vukomanovic, V., Suzic-Lazic, J., Celic, V., Cuspidi, C., Petrovic, T., Ilic, S., Skokic, D., Armando Morris, D., and Tadic, M. (2019). Association between functional capacity and heart rate variability in patients with uncomplicated type 2 diabetes. *Blood Press.* 28, 184–190.

~ W ~

Wade, B. (2013). A Review of Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) Mechanisms at a Cellular Level: A Rationale for Clinical Use. *Am. J. Health Res.* 1, 51.

Walløe, L. (2015). Arterio-venous anastomoses in the human skin and their role in temperature control. *Temp. Multidiscip. Biomed. J.* 3, 92–103.

Wang, F., Zhang, J., Yu, J., Liu, S., Zhang, R., Ma, X., Yang, Y., and Wang, P. (2017). Diagnostic Accuracy of Monofilament Tests for Detecting Diabetic Peripheral Neuropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Diabetes Res.* 2017.

Webb, C.Y., Lo, S.S., and Evans, J.H. (2003). Prevention of diabetic foot using low frequency magnetotherapy. 6, 7.

Weintraub, M.I., and Cole, S.P. (2004). Pulsed Magnetic Field Therapy in Refractory Neuropathic Pain Secondary to Peripheral Neuropathy: Electrodiagnostic Parameters—Pilot Study. *Neurorehabil. Neural Repair* 18, 42–46.

Weintraub, M.I., Herrmann, D.N., Smith, A.G., Backonja, M.M., and Cole, S.P. (2009). Pulsed Electromagnetic Fields to Reduce Diabetic Neuropathic Pain and Stimulate Neuronal Repair: A Randomized Controlled Trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 90, 1102–1109.

Weissberg-Benchell, J., Antidel-Lomaglio, J., and Seshadri, R. (2003). Insulin Pump Therapy: A meta-analysis. *Diabetes Care* 26, 1079–1087.

Wissler, E.H. (2008). A quantitative assessment of skin blood flow in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 104, 145–157.

Wróbel, M.P., Szymborska-Kajaneck, A., Wystrychowski, G., Biniszkiwicz, T., Sieroń-Stołtny, K., Sieroń, A., Pierzchała, K., Grzeszczak, W., and Strojek, K. (2008). Impact of low frequency pulsed magnetic fields on pain intensity, quality of life and sleep disturbances in patients with painful diabetic polyneuropathy. *Diabetes Metab.* 34, 349–354.

~ Y ~

Yamazaki, F., and Sone, R. (2006). Different vascular responses in glabrous and nonglabrous skin with increasing core temperature during exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 97, 582–590.

Yan, Y., Shen, G., Xie, K., Tang, C., Wu, X., Xu, Q., Liu, J., Song, J., Jiang, X., and Luo, E. (2011). Wavelet analysis of acute effects of static magnetic field on resting skin blood flow at the nail wall in young men. *Microvasc. Res.* 82, 277–283.

Yau, J.W.Y., Rogers, S.L., Kawasaki, R., Lamoureux, E.L., Kowalski, J.W., Bek, T., Chen, S.-J., Dekker, J.M., Fletcher, A., Grauslund, J., et al. (2012). Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 35, 556–564.

Yip, W.L. (2015). Evaluation of the clinimetrics of transcutaneous oxygen measurement and its application in wound care. *Int. Wound J.* 12, 625–629.

Yorek, M., Malik, R.A., Calcutt, N.A., Vinik, A., and Yagihashi, S. (2018). Diabetic Neuropathy: New Insights to Early Diagnosis and Treatments. *J. Diabetes Res.* 2018, 1–3.

~ Z ~

Zelman, D.C., Gore, M., Dukes, E., Tai, K.-S., and Brandenburg, N. (2005). Validation of a modified version of the Brief Pain Inventory for painful diabetic peripheral neuropathy. *J. Vasc. Nurs.* 23, 97–104.

Zeng, G., Nystrom, F.H., Ravichandran, L.V., Cong, L.-N., Kirby, M., Mostowski, H., and Quon, M.J. (2000). Roles for Insulin Receptor, PI3-Kinase, and *Akt* in Insulin-Signaling Pathways Related to Production of Nitric Oxide in Human Vascular Endothelial Cells. *Circulation* 101, 1539–1545.

Ziegler, D., Laux, G., Dannehl, K., Spüler, M., Mühlen, H., Mayer, P., and Gries, F.A. (1992). Assessment of Cardiovascular Autonomic Function: Age-related Normal Ranges and Reproducibility of Spectral Analysis, Vector Analysis, and Standard Tests of Heart Rate Variation and Blood Pressure Responses. *Diabetic Medicine* 9, 166–175.

Ziegler, D., Rathmann, W., Dickhaus, T., Meisinger, C., Mielck, A., and for the KORA Study Group (2008). Prevalence of Polyneuropathy in Pre-Diabetes and Diabetes Is Associated With Abdominal Obesity and Macroangiopathy: The MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care* 31, 464–469.

Ziegler, D., Strom, A., Lobmann, R., Reiners, K., Rett, K., and Schnell, O. (2015). High prevalence of diagnosed and undiagnosed polyneuropathy in subjects with and without diabetes participating in a nationwide educational initiative (PROTECT study). *J. Diabetes Complications* 29, 998–1002.

Ziegler, O., Filipecki, J., Girod, I., and Guillemin, F. (2005). Development and validation of a French obesity-specific quality of life questionnaire: Quality Of Life, Obesity and Dietetics (QOLOD) rating scale. *Diabetes Metab.* *31*, 273–283.

Annexes

Annexe 1 – Poster GRRC 2019

What time recording of skin blood flow is sufficient for correct flowmotion wavelet analysis? Methodological study

C. Reynès, O. Maltinti, A. Vinet, Y. Knapp

Laboratoire de Pharm-Écologie Cardiovasculaire EA4278, Avignon Université

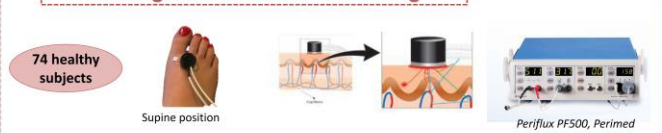
INTRODUCTION

Periodic oscillations of skin blood flow recording by Laser Doppler (flowmotion) allow the study of mechanisms regulating the microcirculation and their interplay. For correct analysis of low-frequency oscillations, it is recommended to monitor the changes in hemodynamics for quite a long time even if no consensus exists. However, short recordings may present advantages obviating artifacts that may be caused by prolonged immobility.

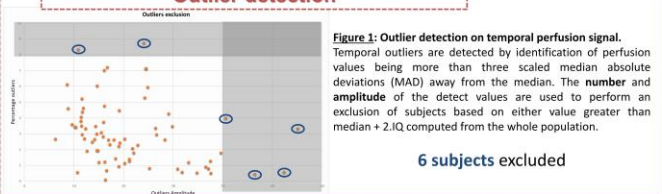
The aim of this work was to compare the frequency spectrum of resting flowmotion waves recorded for 20, 15, 10 and 5 minutes in healthy subjects.

METHODS

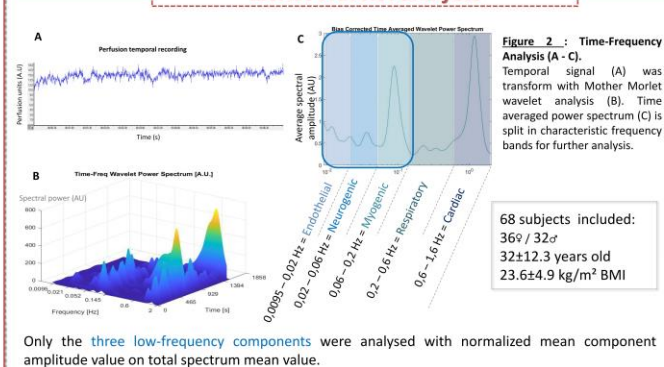
Resting skin blood flow recording



Outlier detection



Morlet Wavelet analysis



RESULTS

Comparison of normalized mean amplitude

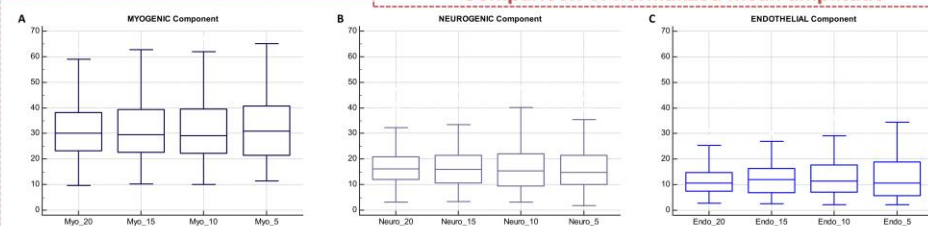


Figure 3 (A - C): Normalized amplitude value of each low-frequency band of 20, 15, 10 and 5 minutes recording.

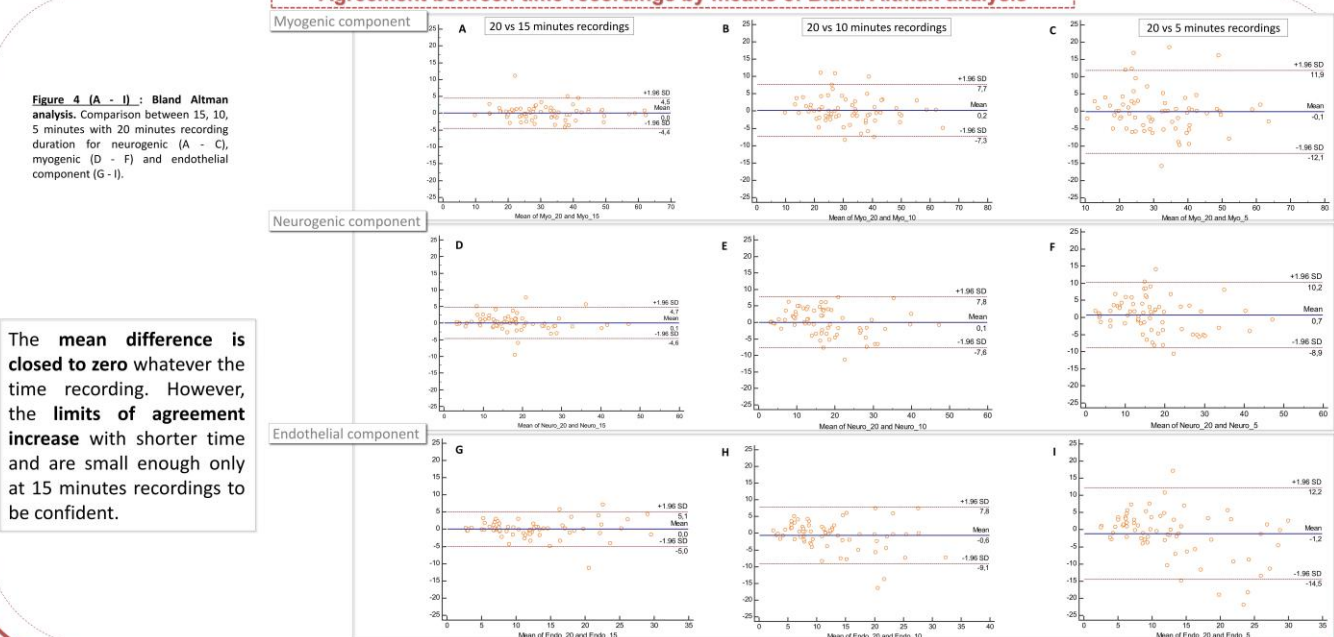
There is **no difference** between 15, 10, 5 minutes recording and 20 minutes on normalized mean amplitude value of low-frequency components.

Correlations between 15, 10 and 5 min recordings with 20 min recording

A) Myogenic component				B) Neurogenic component				C) Endothelial component						
Myo_20	Correlation	Myo_15	Myo_10	Myo_5	Neuro_20	Correlation	Neuro_15	Neuro_10	Neuro_5	Endo_20	Correlation	Endo_15	Endo_10	Endo_5
	0.375	0.932	0.846			0.949	0.886	0.798			0.940	0.848	0.673	
	P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001		P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001		P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Table 1 (A - C): Spearman coefficient correlation of low-frequency component. Each component shows very strong correlation.

Agreement between time recordings by means of Bland Altman analysis



CONCLUSION

According to the high limits of agreement at 10 and 5 minutes, only the 15 minutes recording time should be used in place of the usual 20 minutes recording for clinical purposes.

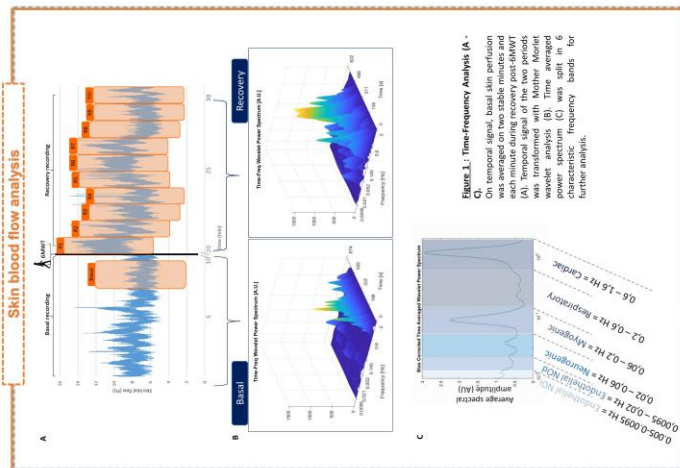
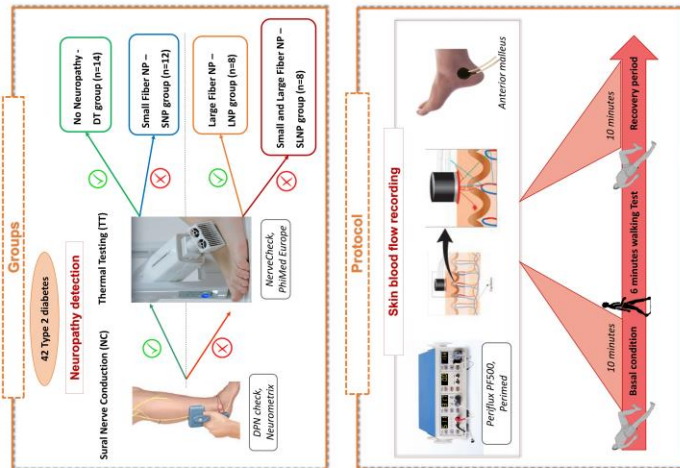


BACKGROUND AND AIMS

Microcirculation dysfunction is common in type 2 diabetes (DT2) and plays a crucial role in diabetic neuropathy (NP) development. NP could affect large and small nerve fibers concomitantly, or separately. Some microcirculatory vasomotor adaptations are altered in DT2 and even more in presence of NP. Exercise-induced vasodilation mainly due to endothelial and neurogenic factors could worsen the microvascular alterations in NP. The question of whether small and/or large fibers NP impacts exercise response is unknown. But, small adrenergic sympathetic fibers are known to innervate arterioles and arteriovenous anastomoses. Accordingly, small fiber NP may be more prone to altered cutaneous blood flow (CBF) response to exercise more than large fiber NP.

Thus, the aim of this study was to compare CBF and flowmotion in basal conditions and in response to acute sub-maximal exercise in DT2 patients without and with small or/and large fiber NP.

MATERIALS AND METHODS



RESULTS

Perfusion

Clinical characteristics and 6MWT performance of the subjects	DT	SNP	LNP	SLNP
Age (yr)	54.6 ± 10.0	57.9 ± 7.1	61.3 ± 7.1	61.3 ± 5.9
HbA1c (%)	8.7 ± 1.2	8.6 ± 0.9	8.4 ± 1.1	8.7 ± 1.1
Diabetes duration (yr)	14.2 ± 9.8	12.8 ± 6.6	12.1 ± 4.4	14.4 ± 6.0
Distance 6MWT (m)	422.8 ± 67.1	438.2 ± 68.9	446.5 ± 106.5	439.8 ± 99.9
% of theoretical HR	64.7 ± 12.1	57.9 ± 8.0	57.9 ± 13.0	59.4 ± 16.7

Table 1. Data were presented as mean ± SD. HbA1c Glycated hemoglobin, 6MWT six minutes walking Test, HR Heart Rate

Our groups were not different in age, HbA1c and diabetes duration. They also walked similar distance at the same relative intensity (around 65% of theoretical maximal HR).

Perfusion

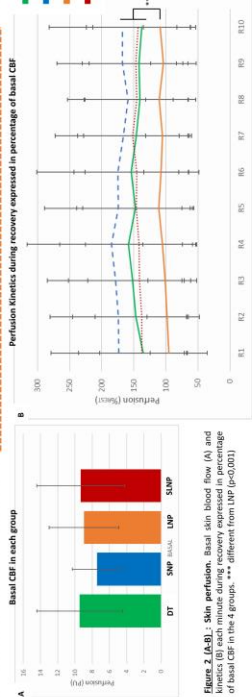


Figure 2. (A,B) - Skin perfusion, basal skin blood flow (A) and kinetics (B) during recovery post-exercise expressed in percentage of basal CBF in the 4 groups. *** different from LNP (p<0.001)

No difference between group in basal CBF (Fig.2A).
No time effect have been found during recovery period but LNP have lower increase of their perfusions than other groups (Fig.2B).

Spectral analysis

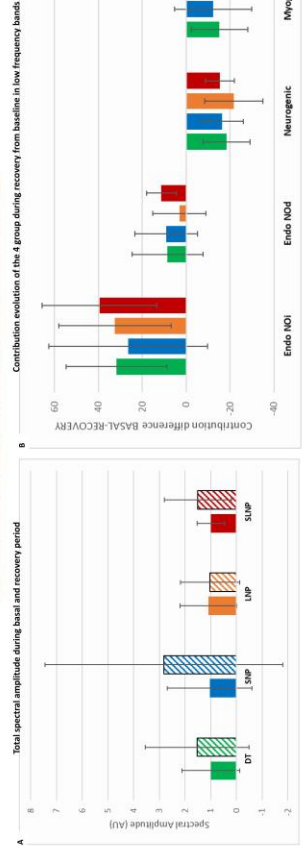


Figure 3. (A,B) - Spectral Analysis. Total spectral amplitude at baseline (filled bar) and during recovery (shaded bar) (A) and differences of contribution from baseline to recovery in the four low frequency bands in each group (B).

No difference of total spectral amplitude between the two recording periods and between groups was noted. (Fig.3A)
We observed significant increased contribution of the two endothelial bands and significant decreased contribution of neurogenic and myogenic bands during recovery. However, these changes were not different between groups (Fig.3B).

CONCLUSION

Only large fiber NP seemed to affect microcirculatory response after exercise with a loss of vasodilative capacity. However underlying mechanisms analyzed by flowmotion showed the same evolution in LNP as other groups with increase of endothelial bands and decrease of myogenic and neurogenic bands. These results need to be confirm with more subjects inclusion but underline that taking into account neuropathy phenotype may contribute to better understand microvascular dysfunction after exercise.

POST-EXERCISE HEART RATE VARIABILITY IN TYPE 2 DIABETES WITH AND WITHOUT CARDIAC AUTONOMIC NEUROPATHY ASSESSED BY STATISTICAL PARAMETRIC MAPPING (SPM).

J-B Beaume^{1,2}, M. Bowen², C. Reynès¹, L. Chatel¹, F. Latil-Plat³, H. Ennaifer³, L. Rocher³, Y. Knapp¹, A. Vinet¹

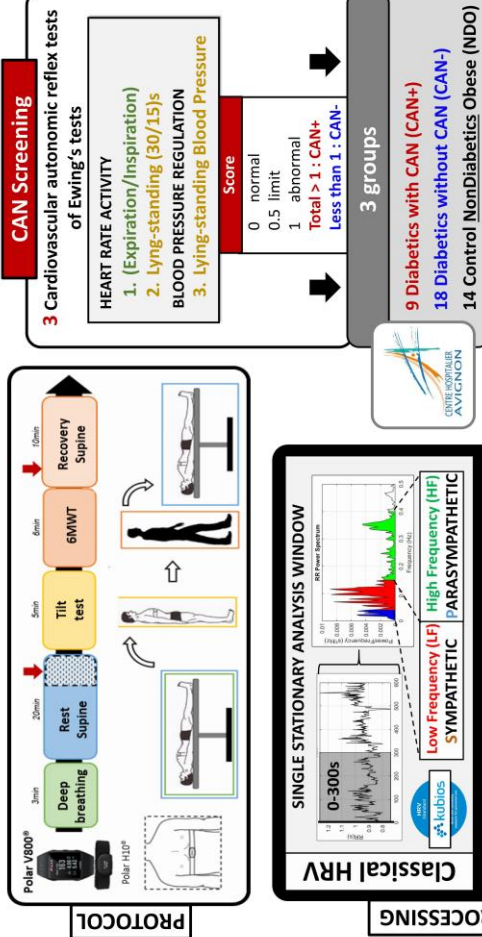
Laboratoire de Pharmaco-Écologie Cardiovasculaire EA4278, Avignon Université¹, Université Savoie Mont Blanc, LIBM EA7424, Chambéry, France², Service Endocrinologie et maladies métaboliques, Centre Hospitalier Henri Duffaut, Avignon³

BACKGROUND & AIMS

Cardiac Autonomic Neuropathy (CAN) is a common asymptomatic complication in type 2 diabetes mellitus (T2DM), causing dysregulation of the sympathovagal balance, responsible for abnormal heart rate and blood pressure regulation. It was suggested an affection first of the parasympathetic and then sympathetic branch. Heart rate variability (HRV) analysis would be an early indicator of the onset of this disease. In this way, several studies have reported that HRV in T2DM is altered at rest, and particularly with CAN. However, this analysis at rest doesn't assess the dynamic of Autonomic Nervous System, and not give an overview of sign or symptoms. Based on "reactivity hypothesis", altered Heart Rate dynamics after exercise in diabetic patients was exaggerated in the presence of CAN. Whether the magnitude of that impairment is worsened during post-exercise recovery phase has not been precisely described in its evolution over time and could show sympathovagal balance dysfunction not visible at rest.

The aim of this study was to compare HRV at rest and during recovery over time from acute submaximal exercise in T2DM patients with/without CAN.

MATERIALS & METHODS



RESULTS

Clinical characteristics & 6MWT performance

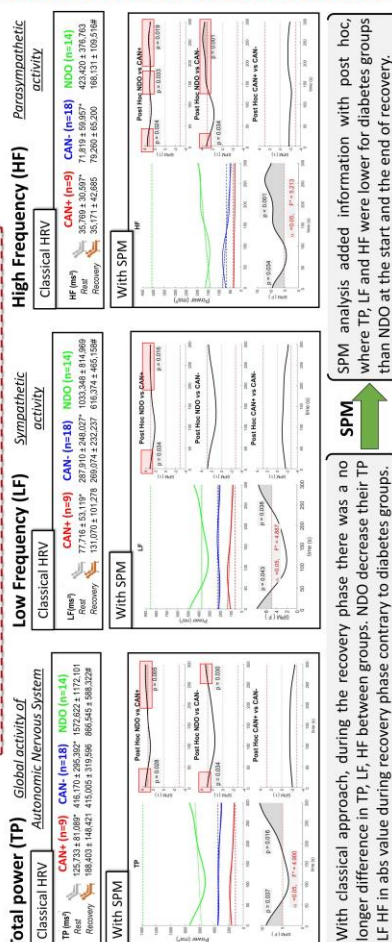
Characteristics	CAN+ (n=9)	CAN- (n=18)	NDO (n=14)
Age (years)	55.7 ± 8.5	57.9 ± 7.4*	52.4 ± 6.7
Gender (n) (Male/Female)	6/3	13/5	6/8
BMI (kg/m ²)	32.3 ± 4.7	31.0 ± 4.7	31.1 ± 3.4
Fasting blood glucose (g/L)	1.5 ± 0.3*	1.5 ± 0.4*	1.0 ± 0.1
HbA1c (%)	8.5 ± 1.3*	8.6 ± 1.3*	5.4 ± 0.3
Diabetes duration (years)	13.7 ± 6.6	14.6 ± 11.5	/
SBP (mmHg)	130.3 ± 14.4	132.6 ± 8.6	126.2 ± 14.3
DBP (mmHg)	81.7 ± 7.9	83.9 ± 8.1	80.0 ± 14.3
HR (beats/min)	83.1 ± 11.2*	76.7 ± 7.8*	65.3 ± 6.6

Data were presented as mean ± SD. *vs NDO p<0.05

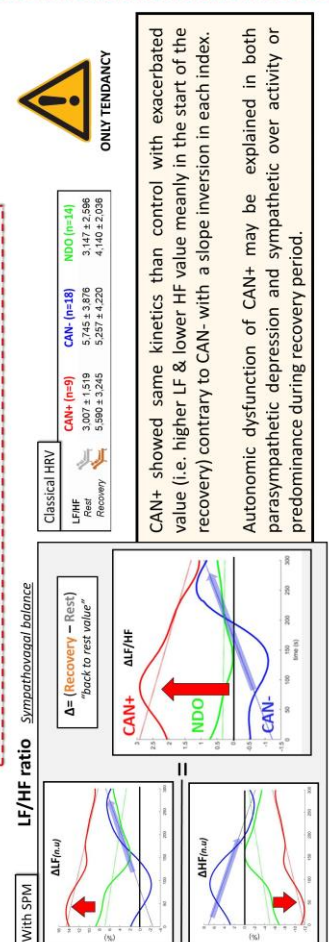
Submaximal Exercise	CAN+ (n=9)	CAN- (n=18)	NDO (n=14)
6MWT distance (m)	402.9 ± 99.4*	459.6 ± 69.4*	550.2 ± 62.7
▶ Theoretical distance (%)	40.2 ± 7.2*	46.7 ± 6.4*	57.2 ± 8.2
RPE (score 1-10)	4.9 ± 2.1*	3.4 ± 1.8	2.8 ± 1.0
HFpeak 6MWT	120.9 ± 12.0	111.7 ± 12.0	119.8 ± 15.2
▶ Theoretical HR (%)	73.5 ± 5.6	68.4 ± 7.4	71.1 ± 9.5

Data were presented as mean ± SD. *vs NDO p<0.05 μ vs CAN- p<0.05

HRV Analysis in Frequency domain (Absolute value)



HRV Analysis in Frequency domain (Normalized Value)



CONCLUSION

This is the first feasibility study of the SPM method for HRV which interestingly allows to continuously describe the dynamics of the Autonomic Nervous System (ANS) during a post-exercise recovery phase. This method could provide a better understanding of the underlying dysfunction of sympathovagal balance in patients with CAN. Since it makes it possible to provide a precision over time of the dynamics of the ANS not visible at rest. Future studies are needed to confirm our results.

Résumé

La neuropathie périphérique diabétique, complication majeure du diabète de type 2, augmente le risque de complications sévères comme les ulcères et l'amputation. La dysfonction microvasculaire présente chez les sujets diabétiques peut expliquer à elle seule le développement de la neuropathie. Les mécanismes de contrôle de la microcirculation (endothéliaux, neurogénique, myogénique, respiratoire et cardiaque) peuvent être appréhendés par l'analyse spectrale des oscillations du flux sanguin : le flowmotion. Cette thèse a tout d'abord défini une nouvelle recommandation du temps d'enregistrement minimal de signaux obtenus par Laser Doppler Flowmeter nécessaire pour faire une analyse fiable de ce flowmotion. Les modifications du flowmotion peuvent précéder l'apparition des indices globaux de complications microangiopathiques chez le DT2. Aussi nous avons ensuite exploré les changements microcirculatoires et du flowmotion lors d'un stress hémodynamique (récupération post-exercice) et lors d'un stimulus vasoconstricteur (déclivité du pied) sur un large spectre de patients : des sujets obèses aux patients diabétiques de type 2 sans neuropathie à ceux avec des stades de sévérité de neuropathie différents. Nous avons ainsi démontré la dégradation des réponses microcirculatoires, à un stade avancé de la neuropathie, basée sur une altération des contributions endothéliale et neurogénique et une suractivation neurogénique à un stade infraclinique. Enfin, l'étude de l'application de champs magnétiques comme thérapie alternative dans la prise en charge de la douleur neuropathique est actuellement en cours. Au final, ces travaux de thèse ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de l'atteinte microcirculatoire du patient diabétique de type 2 avec ou sans neuropathie.

Mots-clés : Diabète de type 2, neuropathie périphérique, microcirculation cutanée, flowmotion, douleur, champs magnétiques pulsés.

Abstract

Diabetic neuropathy is the most common complications of type 2 diabetes. Peripheral neuropathy increases the risk of more severe complications (ulcers and amputations). Microvascular dysfunction alone could be responsible for neuropathy development, making microcirculation an area of interest of many researchers. The control mechanisms of microcirculation (i.e. endothelial, neurogenic, myogenic, respiratory and cardiac) can be explored by spectral analysis of blood flow oscillations, called flowmotion. This thesis has firstly defined a new recommendation of the minimum recording duration of LDF signals needed to make a reliable analysis of this flowmotion. Flowmotion changes may precede global signs of microvascular dysfunction in type 2 diabetes. Our work has studied skin blood flow responses and flowmotion during vasodilative (exercise) and vasoconstrictive (foot lowering) stress. The objectives were to highlight altered mechanisms in diabetic subjects with or without neuropathy. We have demonstrated blunted microvascular responses in more severe stage of neuropathy based on altered endothelial and neurogenic contributions, and a neurogenic overactivity at subclinical stage. Finally, the ongoing study of pulsed electromagnetic fields as an alternative therapy in the management of neuropathic pain requires further experimentations. In the end, this thesis work provided a better understanding of the mechanisms of microcirculatory disease in type 2 diabetic patients with or without neuropathy.

Key words: Type 2 diabetes, peripheral neuropathy, skin blood flow, flowmotion, pain, pulsed electromagnetic field